

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

DEPARTAMENTO DE GENÉTICA



TESIS DOCTORAL

Genes candidatos de tolerancia al aluminio en "*Brachypodium distachyon*"

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

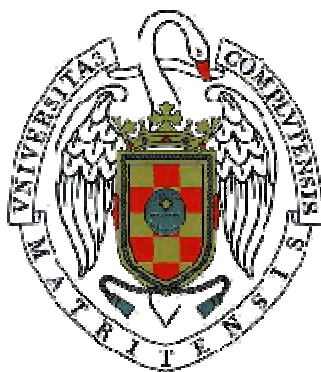
Roberto César Contreras Díaz

Director

César Benito Jiménez

Madrid, 2014

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA



Genes candidatos de tolerancia al aluminio en
Brachypodium distachyon

TESIS DOCTORAL

ROBERTO CÉSAR CONTRERAS DÍAZ

MADRID, 2014

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA

**Genes candidatos de tolerancia al aluminio en *Brachypodium*
*distachyon***

**Memoria que para optar al grado de Doctor en Ciencias Biológicas por la
Universidad Complutense de Madrid presenta**
ROBERTO CÉSAR CONTERAS DÍAZ

Vº Bº Director de la Tesis
Prof. Cesar Benito Jiménez

MADRID, 2014

A mi mujer Isabel

A mis hijos Pope y César

A mis padres y hermanas

AGRADECIMIENTOS

He realizado un largo viaje de estudio doctoral aquí en España junto a mi mujer e hijos del cual no puedo estar más agradecido, todo esto fue posible gracias a BECAS-CHILE de la Comisión Nacional de Investigación de Ciencia y Tecnología (CONICYT) del Gobierno de Chile.

Sin embargo, ningún estudio es posible sin el financiamiento de un proyecto de investigación. Por eso agradezco el financiamiento de los proyectos de investigación AGL 2008-03049/AGR del Ministerio de Educación y Ciencia de España, y el proyecto PR34/07-1581 Santander/Complutense.

Como no voy a mencionar a la persona que me ha entregado su sabiduría y a la cual desde hace mucho tiempo he buscado para que me guíe en el sendero del conocimiento. Gracias maestro, gracias Don César Benito Jiménez por su entrega y su amistad. Todo lo he logrado gracias a usted.

Si bien Don César fue el que me acogió para los trabajos de investigación, hubo personas que me ayudaron a iniciar este viaje desde Chile, por eso agradezco a la Dra. Gertrudis Cabello (UTA), a la Dra. María Jesús Puertas (UCM), a la Dra. Concepción Romero (UCM) y a la Dra. Pilar Gómez (UAM). También quiero agradecer de corazón a los profesores del Departamento de Genética que me han ayudado en los estudios de relaciones filogenéticas y los estudios genéticos de estrés por aluminio a la Dra. Ana M. Figueira, Dr. Javier Espino y al Dr. Javier Gallego.

Además a otros profesores del departamento que me han entregado su tiempo, su sabiduría y recursos financieros (*) para terminar la última etapa de mi investigación, gracias al Dr. Tomás Naranjo, Dr. Juan Luis Santos (*), Dra. Mónica Pradillo, Dra. Pilar Arana (*), Dr. Juan Manuel Vega (*), Dra. Mónica González, Dra. Rosario Linacero, Dra. Carmen Callejas, Dra. M^a Dolores Ochando (*), Dra. Araceli Gallego, Dr. Manuel Díez y Dra. Alicia de la Peña.

A los compañeros de mi grupo de investigación, en especial a Ana L. Oliveira, Javier Silva, Daa Abd El-Moneim, Elisabete Santos, Naike Salvador, Raquel Rouco, Andrea y Marta por darme su amistad y su tiempo, los llevaré siempre conmigo.

Quiero agradecer a los integrantes del grupo de investigación “Lichen Cane” del Departamento de Fisiología Vegetal por su gran ayuda en las cuantificaciones de ácidos orgánicos, a la Dra. M^a Estrella Legaz y el Dr. Carlos Vicente y a sus estudiantes Elena y Eva. Además, agradecer a la Dra. Elena Benavente (UPM), Dr. Antonio Manzaneda (UJ) y el Dr. Miguel A. Casado (UCM) el material vegetal para los estudios de *Brachypodium*.

Quiero agradecer también a dos amigas que descubrí en mi última etapa de investigación, Beatriz Matallanas y mi profesora de cito la Dra. Miriam González, y a todos los integrantes del grupo “Cito A” por su grata compañía, Dra. Cecilia Oliver, Dr. Javier Varas, Dra. Nohelia Valenzuela, Dr. Eduardo Corredor, Dra. Nieves Cuñado y Marina, y a los demás grupos de investigación donde están Alejandra Cruz, Dra. Patricia Marín, Diego Bersabé, Alberto Bellido, y a los mejores técnicos Jose y M^a Carmen.

Todo este trabajo de investigación doctoral en España ha sido posible gracias al apoyo de personas que son la inspiración, los pilares, la base anímica y el amor, me refiero a la familia, por eso agradezco profundamente a mi mejor amiga y mejor madre, mi mujer Isabel Jordán Arias y a mis preciados hijos Pope y César, y de igual manera a mis padres Neri Contreras Ascencio y a mi madre Ana Díaz Sánchez quienes son el mejor ejemplo de mi vida y quienes gracias a su dedicación y enseñanza soy lo que soy, los quiero con toda mi alma. Tampoco puedo olvidar a mis queridas hermanas Priscilla y Sandra quienes desde muy pequeño me han ayudado en mis estudios y a cuidarme, y a todos mis sobrinos quienes me enorgullecen al querer seguir los pasos de su tío.

Quiero agradecer por último a todas las personas que me ayudaron a cuidar de mi familia y a pasar gratos momentos en España, ellos son la Dra. Blanca (Dpto. Fisiología UCM), Luis, Macarena, Cecilia, Mauricio, Jaqueline, Edgar, Miguel y Ruth. Tampoco puedo olvidar de agradecer a los médicos del Hospital San Carlos quienes decidieron operar a mi hijo Pope, siendo quizás una de los regalos más importantes de mi vida.

*“Dame Señor, la perseverancia
de las olas del mar, que hacen
de cada retroceso un punto
de partida para un nuevo
avance”
Gabriela Mistral*

*“Pero yo te seguí queriendo y volveré a buscarte
y nuevamente te abrazaré sobre la tierra reseca
para pedirte otra vez que seas mi mujer
El Desierto de Atacama florecerá de alegría, Las playas
cantarán y bailarán para cuando avergonzada
vuelvas conmigo para siempre....”
Raúl Zurita*

INDICE

I-SUMMARY	1
II-INTRODUCCIÓN	9
1. Toxicidad por Aluminio.....	11
1.1. Inhibición del crecimiento de la raíz.....	14
2. Tolerancia al aluminio.....	18
2.1. Exudación de ácidos orgánicos desde la raíz.....	18
2.2. Genes involucrados en la tolerancia al aluminio.....	21
2.2.1. Genes de la Familia ALMT y MATE.....	21
2.2.1.1. Mecanismos de regulación de la expresión de los genes ALMT y MATE.....	25
2.2.2. Influencia del Al en la actividad enzimática del metabolismo de los ácidos orgánicos....	27
2.2.3. Genes que están involucrados en la tolerancia al estrés por Al pero que no explican la variación natural observada para este carácter.....	30
2.2.4. La pared celular, primer sitio de interacción con él Al.....	31
2.2.4.1. Las enzimas pectin metilesterasas (PME).....	33
2.2.4.2. Las enzimas xiloglucano endotransglucosilasa hidrolasas (XTH).....	34
2.2.5. Estrés oxidativo.....	36
3. El género <i>Brachypodium</i>	37
3.1 Distribución, taxonomía y citología del género <i>Brachypodium</i>	37
3.2 <i>Brachypodium</i> una planta modelo.....	40
3.2.1 Una planta modelo fácil de manejar.....	41
3.2.1.1 Recursos genéticos.....	42
3.2.2 <i>Brachypodium</i> un representante de las gramíneas.....	42
3.2.2.1 El pequeño tamaño del genoma de <i>Brachypodium</i> y su comparación con diversos genomas de Gramíneas.....	43
3.2.3 Amplia colección de T-ADN y mutagenesis usando TILLING.....	46
3.2.4 Herramientas bioinformáticas en <i>Brachypodium</i>	47

3.2.5 Otras herramientas genéticas.....	47
3.3 La pared celular de <i>Brachypodium</i> y bioenergía.....	48
3.4 <i>Brachypodium</i> como modelo de raíz para trigo.....	49
3.5 <i>Brachypodium</i> : interacción planta-patógeno.....	49
3.6 Tolerancia a estrés abiótico en <i>Brachypodium</i>	50
4. Marcadores para estudiar variabilidad genética y relaciones filogenéticas.....	51
4.1 SSRs.....	52
4.2 ISSRs.....	54
III-OBJETIVOS.....	55
IV-MATERIAL Y MÉTODOS.....	59
1. Material Vegetal.....	61
2-Métodos.....	64
2.1 Test de Tolerancia al Aluminio.....	64
2.1.1 Cultivo de plántulas en medio de cultivo hidropónico.....	64
2.1.2 Medición del recrecimiento de la raíz.....	64
2.1.2.1 Tratamiento alternativo de recrecimiento de raíz en cultivo in vitro con Al.....	64
2.1.3 Tinciones histoquímicas.....	65
2.1.3.1 Distribución y acumulación del Al.....	65
2.1.3.1.1 Tinción con hematoxilina.....	65
2.1.3.1.2 Tinción con Morín.....	65
2.1.3.2 Visualización de la peroxidación lipídica.....	65
2.1.3.3 Determinación de la muerte celular.....	66
2.1.3.4 Distribución de H ₂ O ₂	66
2.1.3.5 Producción de calosa.....	66
2.1.3.6 Detección de pectinas.....	66
2.2 Cuantificación de ácidos orgánicos.....	66

2.2.1 Cultivo de plántulas.....	66
2.2.2 Cuantificación de ácidos orgánicos por el método enzimático.....	67
2.2.3 Cuantificación de ácidos orgánicos por RP-HPLC.....	68
2.3.3.1 Preparación de la muestra.....	68
2.3.3.2 Cuantificación del exudado por RP-HPLC.....	68
2.3 Técnicas moleculares.....	69
2.3.1 Aislamiento, purificación y valoración de DNA.....	69
2.3.2 Aislamiento, purificación y valoración de RNA.....	69
2.3.3 Amplificación de ácidos nucleicos por PCR.....	70
2.3.4 Clonación de secuencias.....	70
2.3.5 Análisis de secuencias.....	70
2.3.7 Análisis de expresión génica.....	73
2.3.7.1 Transcripción inversa en ensayos de expresión génica.....	73
2.3.7.2 Determinación de la expresión génica mediante PCR semicuantitativa.....	73
2.3.7.3 PCR cuantitativa en Tiempo Real mediante SIBR Green I.....	75
2.3.7.4 Análisis de las PCR cuantitativas en Tiempo Real.....	75
2.3.8 Identificación de región codificante y secuencias flanqueantes de genes Bd.....	76
2.3.8.1 Caracterización de región codificante, upstream y downstream del gen <i>BdALMT1</i>	76
2.3.8.1.1 Marcador molecular que diferencia citotipos de <i>B. distachyon</i> , <i>B. stacei</i> y <i>B. hybridum</i>	78
2.3.8.2 Caracterización de secuencias flanqueantes de los genes <i>BdMATE1</i> , <i>BdMATE2</i> , <i>BdPME</i>	79

2.3.9 Marcadores para el estudio de la variabilidad genética entre líneas sensibles y Tolerantes en <i>Bd</i> y <i>Bh</i>	79
2.3.9.1 Microsatélites (SSR).....	80
2.3.9.2 Intermicrosatélites (ISSR).....	83
2.3.9.3 Análisis de las Relaciones Filogenéticas.....	84
2.3.9.3.1 Relaciones filogenéticas con SSR.....	84
2.3.9.3.1.1 Cálculo de frecuencias alélicas.....	84
2.3.9.3.2 Análisis estadístico de ISSR.....	85
2.3.9.3.2.1 Polimorfismos.....	85
2.3.9.3.2.2 Índices de similitud.....	85
2.3.9.3.2.3 Construcción de dendogramas.....	85
2.4 Técnicas para la observación de cromosomas por microscopía.....	86
2.4.1 Obtención de raíces.....	86
2.4.2 Preparaciones citológicas en <i>Brachypodium</i>	86
V-RESULTADOS	89
1. Evaluación de la tolerancia al aluminio en especies del género <i>Brachypodium</i>	91
1.1 Evaluación de la inhibición del recrecimiento de la raíz después del tratamiento con Al.....	91
1.2 Evaluación del recrecimiento de la raíz en medio sólido en presencia de Aluminio.....	93
1.3 Evaluación de la tolerancia al Al con tinciones histoquímicas.....	94
2. Cuantificación de ácidos orgánicos.....	98
2.1. Cuantificación de ácidos orgánicos por el método enzimático.....	98
2.2. Cuantificación de ácidos orgánicos por RP-HPLC.....	100
3. Análisis de secuencias.....	101
4. Análisis de expresión génica en <i>Brachypodium</i>	104

4.1 Análisis de expresión génica de transportadores de malato (<i>BdALMT</i>) y citrato (<i>BdMATE</i>).....	104
4.2. Análisis de expresión de genes nucleares que codifican para enzimas de localización subcelular mitocondrial relacionados con la producción de ácidos orgánicos en el ciclo de Krebs.....	111
4.3. Análisis de expresión de genes de superóxido dismutasa (SOD) involucrados en la eliminación de especies reactivas de oxígeno (ROS).....	113
4.4. Análisis de expresión génica de genes involucrados en el mantenimiento de la pared celular.....	114
4.5. Análisis de expresión génica transportador dicarboxilato del tonoplasto.....	115
4.6. Análisis de la región codificante y de las secuencias flanqueantes de los genes <i>BdALMT1</i> , <i>BdMATE1</i> y <i>BdMATE2</i>	116
4.6.1. Caracterización de la región codificante del gen <i>ALMT1</i> en <i>Brachypodium</i>	116
4.6.2. Caracterización de las regiones “upstream” y “downstream” del gen <i>ALMT1</i>	120
4.6.2.1. Marcadores moleculares que diferencian citotipos de <i>B. distachyon</i> , <i>B. stacei</i> y <i>B. hybridum</i>	124
4.6.3. Caracterización de las secuencias flanqueantes “upstream” y “downstream” de los genes <i>BdMATE1</i> y <i>BdMATE2</i>	126
5. Variabilidad genética y establecimiento de relaciones filogenéticas mediante el estudio de microsatélites (SSRs) e inter-microsatélites (ISSRs).....	126
5.1. Microsatélites (SSRs).....	126
5.2. Inter-microsatélites (ISSRs).....	133
6. Determinación del número cromosómico de la muestra diploide tolerante ABR8 y las muestras alotetraploides tolerantes.....	139
7. Relación entre la procedencia de suelos ácidos y la tolerancia al estrés por Al de las líneas de <i>B. distachyon</i> , <i>B. stacei</i> y <i>B. hybridum</i>	140

VI- DISCUSIÓN.....	143
1. Evaluación del crecimiento de la raíz después del tratamiento con Al.....	145
2. Evaluación de la tolerancia al estrés por Al sin necesidad de tinción.....	145
3. Evaluación de la tolerancia al estrés por Al con tinciones histoquímicas.....	146
4. Cuantificación de ácidos orgánicos.....	149
5. Análisis de expresión génica en <i>Brachypodium</i>	150
5.1. Genes de la familia ALMT.....	150
5.2. Genes de la familia MATE.....	154
5.3. Gen STOP1.....	156
5.4. Genes nucleares que codifican para enzimas mitocondriales y citosólicas involucradas en la síntesis de Ácidos Orgánicos.....	157
5.5. Genes SODs.....	158
5.6. Genes PME y XTHs.....	161
5.7 Análisis de la región codificante y de las secuencias flanqueantes del gen <i>BdALMT1</i> , y las secuencias flanqueantes de los genes <i>BdMATE1</i> y <i>BdMATE2</i>	162
5.8. Variabilidad genética y relación entre la procedencia de suelos ácidos y la tolerancia al estrés por Al de las líneas de <i>B. distachyon</i> , <i>B. stacei</i> y <i>B. hybridum</i>	164
5.8.1. Variabilidad.....	164
5.8.1.1 SSR.....	165
5.8.1.2. ISSR.....	167
5.8.2. Relaciones Filogenéticas.....	168
VII. CONCLUSIÓN.....	171
VIII. BIBLIOGRAFÍA.....	175
IX. ANEXO.....	205

I. SUMMARY

SUMMARY

The aluminum (Al) is the most abundant metal in the Earth's crust and is a major factor limit to plant growth and productivity in acid soil, which cover about 50% of the world's potentially arable land surface. The primary site of Al accumulation and toxicity is the root meristem, suggesting that Al interacts with actively dividing and expanding cells. The first symptom of Al toxicity is the inhibition of root growth, resulting in reduced and damaged root systems and limited water and mineral nutrient uptake. Many species evolved mechanisms to improve their survival in acid soils. Even before these mechanisms were fully understood they were divided into those that were likely to exclude Al from the root (exclusion mechanisms) and those that would enable plants to cope Al safely once it enters in the symplast (internal tolerance mechanisms). The majority of current evidence has shown that organic acids play important roles in detoxifying Al both internally and externally. The exudation of a variety of organic anions such as citrate, malate and oxalate has been reported in several crop species due to excessive Al, and a good correlation between organic acid anion secretion and Al resistance has been established. There is considerable variability in Al tolerance within some species and this diversity has been useful to breeders in developing Al-tolerant cultivars in various crops. Molecular strategies have been used to detect genes implicated in the plant response to Al. Several genes have been found to be activated by Al in tolerant and susceptible genotypes in species like wheat, pea, rice, *Arabidopsis*, rye, barley, soybean and maize.

Brachypodium distachyon (2n=10) is a small temperate grass with all the attributes needed to be a modern model organism including simple growth requirements, small genome, self-fertility and short life cycle, with a minimum of six weeks from seed to seed. In addition, its closer relationship to economically important Triticeae species, such as *Triticum* spp., *Hordeum* spp. and *Oryza sativa*, the tropical cereal with a fully sequenced genome, gives *Brachypodium* greater relevance in the development of a wide range of comparative analyses of gene expression and regulatory mechanisms. Other species of the *Brachypodium* genus are *B. stacei* (2n=20) and *B. hybridum*, an allotetraploid cytotype (2n=30) that came from a hybrid between *B. distachyon* and *B. stacei*. To our knowledge, there are no published reports on the mechanism of Al tolerance in *Brachypodium*. Therefore, we collected some diploid (*B. distachyon*) and allotetraploid samples (*B. hybridum*) to study their Al tolerance. In the present study, the main aims were: to determinate the grade of aluminum tolerance in different lines from *B. distachyon* (*Bd*), *B. stacei* (*Bs*) and *B. hybridum* (*Bh*); to evaluate root exudation of organic acids (malate and citrate) from sensitive and tolerant genotypes; to measure the transcriptional changes of different candidate genes related with Al-tolerance stress; to study the coding and promoter region of the *BdALMT1* gene in tolerant and sensitive genotype; to analyse genetic diversity using microsatellites (SSRs) and inter-microsatellites (ISSRs) and establish phylogenetic relationships between different lines from *Bd* and *Bh*. Sixty nine diploid lines (2n=10) of *B. distachyon* (*Bd*), 38 allotetraploid (2n=30) samples of *B. hybridum* (*Bh*) and nine diploid lines (2n=20) of *B. stacei* (*Bs*) of diverse geographic origins were analysed.



Evaluation of Al tolerance using relative root growth

To determinate the level of aluminum tolerance and the classification of different *Brachypodium* lines, we analyse the relative root growth after Al stress and we visualized Al accumulation and oxidative stress in roots with histochemical dyes. To estimate the capacity for root growth in diploid and allotetraploid plants, the relative root growth of several *B. distachyon* diploid lines, one *B. stacei* diploid sample (E66) and several *B. hybridum* allotetraploid lines were compared. All diploid samples treated with Al at 10 or 40 μM showed reduced relative root growth except ABR8 line (tolerant). The relative root growth was reduced in several allotetraploid samples (M12, M11, E82, GRA 788, E80 and E78) while no reduction or a minimal reduction of relative root growth was observed in five allotetraploid samples (M2, M15, M10, HP and CB). The diploid and allotetraploid samples that showed a higher root growth were classified as tolerant whereas the samples with a minimum (or without) root growth were classified as sensitive.

Evaluation of Al tolerance using different histochemical staining methods

The accumulation of Al in the roots was visualised by staining with hematoxylin and morin fluorescent dye. After Al treatment, the roots of diploid and allotetraploid sensitive plants were intensely stained, whereas the roots of tolerant diploid and allotetraploid lines were not stained. The root cell death as consequence of Al treatment was visualised by Evans Blue staining. The sensitive diploid lines showed an intense staining, the tolerant diploid lines exhibited a very low intensity of staining in a small root zone, and the tolerant allotetraploid samples did not show cell death (colourless roots). The lipid peroxidation was visualised with Schiff's reagent. All roots of sensitive diploid and allotetraploid lines tested with this histochemical stain developed a magenta colour around the elongation zone produced in the same region to Evans Blue and hematoxylin except one tolerant diploid line (ABR8) and seven tolerant allotetraploid samples (AR, CB, CA, CO, EM, HP and SE). As regards H_2O_2 production, the staining with the DCF-DA fluorescent dye indicated, also, that sensitive lines produce more H_2O_2 than tolerant plants. The different types of Al-tolerance histochemical evaluations always produced the same results: sensitive lines exhibited an intense staining (or darkness) according to their low or inexistent root regrowth, and tolerant lines were not coloured according to their high root regrowth.

Without Al, the root apices of the ABR8 tolerant line showed a low intensity with ruthenium red whereas, after 24 h of Al treatment, the apices of tolerant line showed a high intensity of staining. However, in the case of sensitive line (ABR1), the result was the contrary. The callose accumulation in the root not showed changes in response of Al stress in both kind of lines, tolerant and sensitive.

Evaluation of Al tolerance without any staining methods

In addition, we evaluated, without any staining, the light or dark appearance of plant root tips from diploid and allotetraploid in the presence of 10 μM $\text{AlK}(\text{SO}_4)_2$. The sensitive lines showed dark roots, indicating their low or inexistent root regrowth (sensitive condition),

whereas the tolerant lines exhibited light roots, according to their high root regrowth (tolerant condition). This is the first time that it has been possible to evaluate the Al tolerance of a grass species without using any staining method.

The 69 *Bd* diploid and the 38 *Bh* allotetraploid samples used in this work were tested for Al tolerance without any staining, with hematoxylin and with Schiff's reagent. Only one diploid line (ABR8) and ten allotetraploid samples (CB, CA, AR, SE, EM, HP, CO, M2, M10 and M15) showed roots without colour or stain, whereas the remaining 68 diploid and 27 allotetraploid lines showed roots with an intense dark or magenta colour of stain.

Organic acid exudation

The root exudation of organic acids was also studied. Citrate and malate exudations were estimated in the roots of the ABR1 and ABR8 diploid lines. After 24 h of Al treatment, root citrate and malate exudations of ABR8 tolerant line increased significantly the induction of citrate being more intense. ABR8 excreted about 20-fold more citric acid and about 5-fold more malic acid than Al-sensitive genotype ABR1 over 24 h. The amount of citrate exudates was very low 3 h after the Al exposure in both lines. However, the amount of malate exudates was higher than the citrate exudates after 3 h of Al shock. Malate and citrate effluxes were also estimated in the roots of the GRA 788 and CB allotetraploids. The amount of citrate exudates was very low in the allotetraploid genotype GRA 788 (sensitive) after 3 and 24 h of Al treatment. The citrate efflux of tolerant genotype CB increased after 24 h of Al treatment, but the induction of citrate exudation was more intense in the tolerant diploid ABR8 than in the tolerant allotetraploid CB. The malate efflux of tolerant CB increased significantly after 24 h of exposure to Al. However, the malate exudation of Al-sensitive allotetraploid GRA 788 was very low.

Changes in the mRNA expression of different Al-tolerance candidate genes

By means of *qRT-PCR* and *semi-qRT-PCR*, we have quantified the relative mRNA level of different Al-tolerance candidate genes. The genes were grouped into several functional categories. The first group consisted of genes encoding organic acids transporters and a transcription factor gene. We have quantified the relative mRNA level of seven different Al-tolerance candidate genes (*BdALMT1*, *BdALMT2*, *BdALMT3*, *BdMATE1*, *BdMATE2*, *BdMATE3* and *BdSTOP1*) from roots and shoots of diploid ABR1 and ABR8 plants in absence of Al and treated at 20 μ M Al for 24 h. Moreover *qRT-PCR* from GRA 788 and CB allotetraploid plants was carried out to compare the expression level of *BdALMT1* and *BsALMT1* genes using specific primers for each genome. The *BdALMT1* mRNA was mainly expressed (without and with Al) in the roots but not in the shoots of the diploids (ABR8) and tetraploid (CB) tolerant lines. This transcript was poorly induced by Al treatment in diploid ABR1 and GRA788 roots (sensitive), whereas it was not induced in the diploid ABR8 and CB roots (tolerant). A higher amount of transcript was observed in ABR8 and CB than ABR1 and GRA788 in absence of and also with Al. The behaviour of the *BsALMT1* transcript from *B. stacei* is similar to the behaviour of the *BdALMT1* transcript from *B. distachyon* in the roots of allotetraploid samples. However, the *BsALMT1* mRNA is also expressed in shoots of the sensitive GRA788 being moderately



repressed by Al. The relative levels of *BdALMT2* and *BdALMT3* mRNA were higher in the shoots than roots of ABR1 and ABR8 with and without Al treatment. However, Al stress does not induce changes in the expression of these genes.

The expression of the *BdMATE1* and *BdMATE2* genes was higher in the roots than shoots in ABR1 and ABR8, whereas *BdMATE3* was higher in shoots than roots. In addition, in roots from ABR1 the expression was induced for *BdMATE1* and *BdMATE2* by Al, however in absence of Al the amount of transcripts were higher in roots from ABR8 than ABR1. No variation was observed with respect to relative amount of *BdSTOP1* mRNA in the roots and shoots of ABR1 and ABR8 in the absence and presence of Al, this gene was not induced by Al stress. The expression of a vacuolar transporter gene (*BdtDT*) involved with malate transporter was higher in the roots than shoots in ABR1 and ABR8 in absence of Al. However, with Al stress was higher repressed in roots from ABR8 and ABR1.

The second group included genes encoding the enzymes involved in citrate and malate metabolism. The *BdMDH1*, *BdMDH2*, *BdFH* and *BdCS* genes were mainly expressed in the roots but not in the shoots of the diploid tolerant (ABR8) and diploid sensitive (ABR1) in absence of Al. This transcript was repressed by Al treatment more in diploid ABR1 roots (sensitive) than diploid ABR8 (tolerant). No variation was observed with respect to relative amount of *BdME* mRNA in the roots and shoots of ABR1 and ABR8 in the absence and presence of Al, this gene was not induced by Al stress.

The third group included genes encode the antioxidant enzymes of the SOD family. Two CSOD genes (*BdCSOD1* and *BdCSOD2*) were mainly expressed (without and with Al) in the roots but not in the shoots of the diploid tolerant (ABR8) and diploid sensitive (ABR1), these genes were not induced by Al stress. No variation was observed with respect to relative amount of *BdMSOD1* mRNA in the roots and shoots of ABR1 and ABR8 in the absence and presence of Al, this gene was not induced by Al stress.

The fourth group included genes encoding protein and enzymes related with cell wall organization. Expression of the *BdPME* gene occurred mainly in the roots and was very low in leaves. Moreover, the amount of this mRNA in root not treated with Al was greater in the tolerant ABR8 than in the sensitive (ABR1). *BdPME* mRNA levels decreased in response to Al stress in the roots of ABR8 and no expression changes were detected in the roots of ABR1. The expression level of *BdXTH5*, *BdXTH14*, *BdXTH15* and *BdXTH31* were changed in response to Al stress. These genes were mainly expressed in the roots but not in the shoots of the tolerant and sensitive lines. Differential gene expressions were showed by tolerant and sensitive genotypes in response to Al stress.

The promoter of the *ALMT1* gene in *Brachypodium*

Taking into account the different expression patterns of the *ALMT1* gene between the roots of the sensitive and tolerant plants from the *Bd* and *Bh* species, we decided to study the coding region of this gene in *B. distachyon* (ABR1 and ABR8) and *B. stacei* (E66). Two SNPs were detected between the exons of *BdALMT1* from the sensitive ABR1 and tolerant ABR8

lines: one in exon 1 and another in exon 5. Regarding the introns, five SNPs and one Indel were observed: one SNP and one Indel of 11 bp in intron 1, three SNPs in intron 2 and one SNP in intron 3. In addition, the sequence of *BsALMT1* presented many polymorphisms compared to the three sequences of *BdALMT1* (ABR1, ABR8 and Bd21) mainly in the first exon.

The main difference between the promoter regions of the *BdALMT1* gene of sensitive and tolerant plants is the presence of an insertion only in tolerant lines. This insertion is located about 1,789 bp before the ATG site. We have calculated the probability of association of two independent events, the presence or absence of the insertion in the promoter of *BdALMT1* gene and Al sensitivity or Al tolerance, using a hypergeometric probability model. The probability of the association between the insertion and Al tolerance was estimated as 1.6% in diploid lines and 2.87×10^{-9} % in allotetraploid plants, both results being significant at 5%.

Genetic diversity and phylogenetic relationships in *Brachypodium*

The genetic diversity and phylogenetic relationships of 52 diploid lines of the *B. distachyon* and 33 allotetraploid lines of *B. hybridum* from different sources were studied using microsatellites (SSRs) and inter-microsatellites (ISSRs). It used sixteen SSR primers pairs and seven ISSR primers. In diploid lines, the average PIC (polymorphic index content), a measure of diversity, was 0.42 for SSRs. In the allotetraploid lines PIC value mean was 0.5 for SSRs. The mean number of alleles in the diploid lines was 3.4 and in the allotetraploid lines was 3. The average PIC was lower in the allotetraploid tolerant than allotetraploid sensitive. The average PIC with ISSRs was 0.23 and 0.33 in diploid and allotetraploid, respectively. The average PIC values were 0.16 and 0.24 in tolerant and sensitive, respectively. Moreover, several exclusive alleles and DNA fragments were detected in the tolerant lines.

The phylogenetic analyses revealed (with SSRs and ISSRs) that two species *B. distachyon* and *B. hybridum* were grouped into two different clusters. Moreover, the tolerant and sensitive genotypes were grouped into two different sub-clusters. All the tolerant lines came from geographic locations with acidic soils. These results suggest a common origin for allotetraploid tolerant lines and also indicate that the tolerant condition of these genotypes could be explained by their adaptation to acidic soils.

These results obtained indicate that *Brachypodium distachyon* is a good model plant for study of tolerance aluminum stress in the Poaceae family.



II. INTRODUCCIÓN

1. Toxicidad por Aluminio

El aluminio (Al) es el tercer elemento más abundante en la superficie terrestre (Yaroshevsky 2006), forma parte de muchos minerales y es un factor limitante en los cultivos agrícolas, reduciendo el crecimiento y la productividad en suelos ácidos (Foy y col. 1978, Kochian 1995, Kochian y col. 2004). La toxicidad por Al es la segunda causa más importante de disminución de los rendimientos agrícolas después del estrés hídrico (Bot y col. 2000). La toxicidad por Al se produce en suelos ácidos, con un pH inferior a 5,5, debido a la formación de cationes trivalentes rizotóxicos de Al^{3+} que se solubilizan a partir de aluminosilicatos y otros minerales no tóxicos del suelo (Kochian 1995, Kochian y col. 2004, Kinraide y col. 1992). Los complejos orgánicos e inorgánicos de Al se consideran como no fitotóxicos o considerablemente menos tóxicos (Kerven y col. 1989).

La acidez de los suelos aumenta por diversos factores, entre ellos, prácticas de labranza agrícola y lluvia ácida (Aniol y col. 1980, Haug 1983, Kennedy 1986). La acidificación es un proceso natural que puede acelerarse por prácticas de cultivo, al usar nitrógeno (N) de fertilizantes como urea, sulfato de amonio, u otros fertilizantes que contengan nitrógeno o amonio. La acidificación de los suelos puede revertirse añadiendo cal. Los materiales empleados suelen ser óxidos, hidróxidos, carbonatos y silicatos de Ca y/o Mg. Una de las enmiendas más utilizadas es la cal agrícola, la cal se dispersa al voleo sobre la superficie del suelo y luego se mezcla arando (Anderson y col. 2013). La lluvia ácida afecta la química de los suelos y aguas de drenaje de los ecosistemas forestales acelerando la acidificación de los suelos ácidos (Binkley col. 1989). La liberación de aniones ácidos como SO_4^{2-} y NO_3^- en el suelo puede contribuir significativamente a la acidificación de suelos y de aguas superficiales (Reuss y Johnson 1986). La acidificación del suelo también aumenta por aplicaciones de nitrógeno (práctica normal de labranza) en cantidades que exceden la absorción de los cultivos (Adams 1984).

La toxicidad por Al es uno de los tópicos más importantes de investigación porque muchas de las plantas cultivadas son susceptibles a suelos ácidos, y su crecimiento y rendimiento está limitado por el Al^{3+} . De los suelos actualmente cultivados, entre el 30 y el 40% son terrenos de tipo ácido (Haug 1983). Von Uexkull y Mutert (1995) estimaron que los suelos ácidos a nivel global ocupan el 30% de las superficies libres de hielo y principalmente están situados en trópicos húmedos y la región boreal, además gran parte de estos suelos ácidos (67%) están cubiertos por bosques (Figura 1).



El aluminio tiene un efecto antagonista sobre la absorción de Ca y Mg (Marschner 1995). La toxicidad por Al produce desordenes nutricionales en los que están involucrados el P, Mg y Mn. En presencia de Al disminuye el metabolismo y la capacidad respiratoria de las raíces y queda afectado el transporte de P. Sin embargo, en ausencia de Al las plantas retoman la absorción de Ca y K, sin cambios significativos en el rendimiento (Bennet y col. 1986).

Los componentes y procesos celulares más importantes afectados por el Al son: la división celular (Silva y col. 2000), la estructura y propiedades físicas de la membrana plasmática (Zhang y col. 1997), la transducción de señal mediada por fosfoinosítido y homeostasis del Ca citoplasmático (Jones y Kochian 1995, Rengel y Zhang 2003), el estrés oxidativo (Yamamoto y col. 2003), la dinámica del citoesqueleto (Sivaguru y col. 1999), la desorganización del citoesqueleto, pared celular, membrana plasmática y deterioro de las funciones apoplásticas y simplásticas (Horst y col. 1999, Horst y col. 2010).

Una revisión efectuada por la FAO indica que casi un tercio de los países tienen problemas de toxicidad por Al en el 25% o más de su superficie (Bot y col. 2000). Los suelos ácidos en el mundo ocupan grandes extensiones de terreno potencialmente cultivable, que podría utilizarse para reforestar y mejorar los pastos para producción animal, un ejemplo de esta situación se da en la sabana de Brasil, en Colombia, Venezuela, África central y sudeste Asiático (Bourlaug y Dowsnell 1997).

En Europa, los países escandinavos se encuentran entre las regiones más afectadas y en la Federación Rusa existen alrededor de 5 millones de hectáreas de suelo cultivable ácido. En Polonia, el 60% de la superficie cultivable está clasificada como ácida o muy ácida (Bogouszewski 1980) y en Portugal el 80% de los suelos han sido definidos como ácidos (Almeida 1955). En España existen problemas de suelos ácidos sobre todo en la parte oeste, en Galicia y Extremadura (López y Grau 2004).

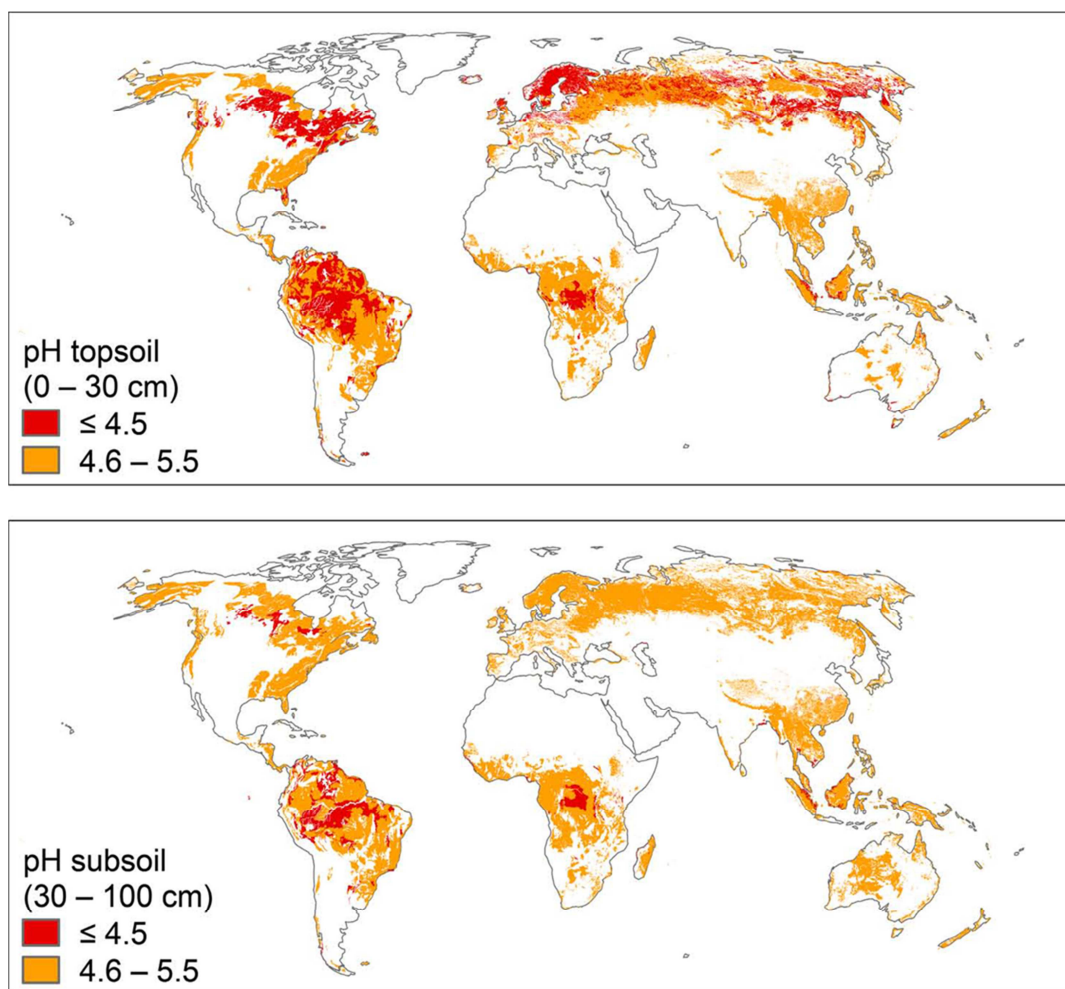


Figura 1. Suelos ácidos en el mundo. En la figura superior se observa el pH de la capa superficial del suelo, entre 0 y 30 cm. En la figura inferior se observa el pH de una capa más profunda del suelo entre 30 y 100 cm. Fuente: Brunner y Sperisen 2013

Se espera que la población mundial aumente en dos billones de personas para el año 2050. Por ello, la producción de cultivos necesitará incrementarse más del 50% para sostener la demanda de alimentos, fibra y carne animal. Estos objetivos podrían cumplirse aumentando la superficie cultivable y los rendimientos. El aumento de la superficie cultivable conducirá a la utilización de suelos ácidos que no han sido empleados hasta ahora para cultivos económicamente importantes (Ryan y col. 2011). Por tanto, el estudio de la base molecular de la tolerancia al estrés por Al en suelos ácidos y el desarrollo de variedades tolerantes son objetivos de gran interés en la investigación.



1.1. Inhibición del crecimiento de la raíz

Desde 1918, la toxicidad por Al en suelos ácidos se identificó como la causa principal de inhibición del crecimiento de las raíces en cebada (*Hordeum vulgare*) y centeno (*Secale cereale*) (Hartwell y Pember 1918). También se ha observado inhibición del crecimiento de la raíz en trigo (*Triticum aestivum*) y maíz (*Zea mays*) (Figuras 2 y 3) (Delhaize y Ryan 1995, Ryan y col. 1993). Las raíces dañadas por Al son más pequeñas y quebradizas, su punta se vuelve más gruesa y de color marrón y aparecen muchas raicillas laterales que son poco eficientes absorbiendo nutrientes y agua (Foy y col. 1978). En el ápice de la raíz (cofia, meristemo, y zona de elongación) se acumula más Al y se produce un mayor daño físico que en tejido de raíz maduro o diferenciado (Delhaize y Ryan 1995). Ryan y col. (1993) demostraron que el Al inhibe el crecimiento en los 2-3 mm del extremo de la raíz de maíz (cofia y meristemo), sugiriendo que el meristemo es el sitio primario afectado por la toxicidad. Según Tice y col. (1992) entre el 50 y el 70% del Al se acumula en la punta de las raíces, de este más de la mitad se localiza en el simplasto y entre un 30 y 40% en el espacio apoplástico. Además, Lazof y col. (1994) detectaron Al en el simplasma de raíces de soja (*Glycine max*) sólo después de 30 minutos de haberlas expuesto al Al, demostrando que la entrada del aluminio a las células puede ocurrir antes de la inhibición del crecimiento de la raíz. Por otro lado, otras publicaciones indican que hay gran acumulación de Al en la pared celular, entre un 75 y un 95% (Huett y Menary 1979). Aunque la mayoría del Al presente en la raíz está asociado al apoplasto una pequeña fracción de Al entra rápidamente al simplasma e interactúa con objetivos simplásticos (Lazof y col. 1994).

Las diferentes especies vegetales y las distintas líneas, cultivares o variedades, en definitiva, los diferentes genotipos de una misma especie difieren ampliamente en su capacidad para tolerar el efecto del Al en suelos ácidos, estando estas diferencias controladas genéticamente (Foy 1988). Así hay especies inherentemente más tolerantes, por ejemplo: yuca (*Manihot esculenta* Crantz), caupí o chícharo salvaje (*Vigna unguiculata* L. Walp), cacahuete o maní (*Arachis hypogaea*), guandul (*Cajanus cajan* L. Millsp.), patata (*Solanum tuberosum*), arroz (*Oryza sativa* L.) y centeno (*Secale cereale* L.) (Little 1988). Dentro de una misma especie también hay diferencias entre genotipos. En trigo hay genotipos tolerantes (ej. Carazinho) que acumulan menos aluminio que los sensibles (ej. Egret) (Delhaize y Ryan 1995). En centeno la mayoría de los cultivares son resistentes al estrés por Al (ej. Ailés) aunque existen líneas consanguíneas como Riodeva que son más sensibles dentro de esta especie (Gallego y Benito 1997). En la familia Triticeae, el centeno es la especie más tolerante seguido por Triticale (*X Triticosecale* Wittmack), trigo (*Triticum aestivum* L.) y cebada (*Hordeum vulgare* L.) (Mugwira y col. 1976, 1978, Aniol y Madej 1996).



Figura 2. Plántulas de trigo crecidas en suelo ácido con distintos rangos de concentraciones de Al, se observa la disminución del crecimiento de la raíz a altas concentraciones de Al. Fuente: adaptada del Department of Agriculture and Food of Government of Western Australia (<https://www.agric.wa.gov.au/soil-acidity/effects-soil-acidity>)



Figura 3. La imagen muestra un cultivar de maíz tolerante al estrés por Al (izquierda) y otro sensible (derecha). Prueba llevada a cabo en suelo ácido en Brazil. Fuente: <http://www.news.cornell.edu/stories/2010/02/aaas-meeting-cloned-sorghum-aluminum-tolerant>

Las pruebas de tolerancia suelen llevarse a cabo en laboratorios e invernaderos debido al buen control del ambiente, ahorro de tiempo y alta precisión, siendo menos invasivas y pudiendo aplicarse en estados tempranos de desarrollo, mientras que las pruebas en condiciones de campo son más laboriosas (Carver y Ownby 1995). En las evaluaciones de campo los dos



problemas más importantes son las infecciones por hongos patógenos (favorecidas por el bajo pH y la aplicación de limo) y la variación espacial del pH en la superficie y en las subcapas de suelo. (Stølen y Andersen 1978, Baier y col. 1995, Johnson y col. 1997). Los resultados obtenidos con soluciones nutritivas en el laboratorio han demostrado correlacionarse muy buenas con los de campo, ya que las plantas clasificadas como tolerantes normalmente muestran un mejor comportamiento y características agronómicas adecuadas en suelos ácidos (Carver y col. 1988, Rajaram y Villegas 1990, Ruiz-Torres y col. 1992, Rengel y Jurkic 1993, Baier y col. 1995).

En un principio se hicieron estudios para evaluar el grado de tolerancia de las plántulas a través de parámetros agronómicos como el peso seco de las raíces y de la hoja, el número de hijuelos y el número de espigas (Mugwira y col. 1976, Manyova y col. 1988). Actualmente, dentro de las estrategias más utilizadas para clasificar el grado de tolerancia al aluminio se puede citar la medición del crecimiento de la raíz y diferentes tinciones de raíces con hematoxilina y morín para observar acumulación de aluminio, DCF-DA (2',7'-diclorofluoresceína diacetato) para observar producción de H_2O_2 , reactivo de Schiff para estimar la peroxidación lipídica, azul de Evans para ver muerte celular, azul de anilina para la acumulación de calosa y rojo de rutenio para detectar acumulación de pectinas (Hede y col. 2001, Carver y Ownby 1995, Yin y col. 2010, Kauss 1992, Iwai y col. 1999).

Baier y col. (1995) desarrollaron una prueba para comparar la longitud de la raíz de distintos genotipos de trigo: crecieron plántulas durante cuatro días en medio hidropónico con solución nutritiva a pH ácido y después de añadir Al midieron la longitud de la raíz, identificando claramente genotipos tolerantes y sensibles. Al comparar este método con evaluaciones de tolerancia al estrés por Al en suelos ácidos y ensayos de campo obtuvieron una significativa y alta correlación entre los ensayos, quedando establecida la prueba con solución nutritiva en cultivo hidropónico como un buen método para estimar la tolerancia al estrés por Al en programas de mejora.

El método del crecimiento de la raíz habitualmente tiene en cuenta dos parámetros: el crecimiento de la raíz (RG) y el índice de tolerancia de las raíces (RTI) (Baier y col. 1995), el primero (RG) mide el crecimiento de la raíz después del tratamiento con Al y el segundo (RTI) consiste en comparar el crecimiento de la raíz con Al y el crecimiento de la raíz sin Al. Sin embargo, al estimar la tolerancia solamente mediante el crecimiento de la raíz después de tratar con Al (RG) obtenemos una estimación combinada de la tolerancia (alelos responsables de la tolerancia al estrés por Al) y del vigor de la raíz. Por tanto, la realización de tratamientos sin Al y con Al (RTI) mejora las estimaciones (Hede y col. 2001) atribuyendo fundamentalmente las diferencias al tratamiento.

La hematoxilina es un compuesto que se obtiene de la planta leguminosa *Haematoxylum campechianum* L. El método de tinción con hematoxilina es una herramienta poderosa para evaluar la tolerancia al aluminio. La hematoxilina forma complejos con el Al presente en los tejidos que ha sido inmovilizado como $AlPO_4$ (Ownby 1993). A medida que se incrementa la



cantidad de Al absorbida por la raíz aumenta la intensidad de tinción con hematoxilina (a mayor tinción menos tolerancia) (Polle y col. 1978). Otro procedimiento para usar la hematoxilina, es evaluando la habilidad de las plántulas para continuar el crecimiento de la raíz después de un tratamiento con una alta concentración de Al (Aniol 1984). Este método puede aplicarse para determinar la tolerancia al aluminio midiendo el recrecimiento de la raíz (Aniol y Gustafson 1984, Gallego y Benito 1997), sin embargo, las plántulas muy sensibles quizás no mostrarán recrecimiento debido al efecto tóxico de este tinte sobre el meristemo. La hematoxilina y el método de crecimiento de la raíz bajo estrés por Al, identifican genotipos con crecimiento vigoroso, pero no logran detectar la tolerancia al aluminio en genotipos de vigor pobre. Estos genotipos sólo se pueden identificar usando el índice de tolerancia de la raíz (RTI). Sin embargo, el método con hematoxilina ha sido utilizado para el cribado de grandes poblaciones segregantes (Hede y col. 2002).

La comparación de plantas de una línea sensible y otra tolerante en trigo, previamente clasificadas con hematoxilina, puso de manifiesto que las tolerantes presentaban un 12% más de espigas, un 11% más de biomasa y un 14% más semillas más que las sensibles bajo condiciones ácidas. Por lo que la tinción de hematoxilina es una buena herramienta en la identificación potencial de genotipos de trigo con alta sensibilidad a suelos ácidos (Ruiz-Torres y col. 1992)

La concentración de Al óptima para el cribado de los genotipos depende las especies evaluadas. Por ejemplo, centeno es más tolerante que trigo, así una concentración óptima para centeno puede ser una concentración nefasta para trigo. Si el propósito es cuantificar el grado de tolerancia, mediante la estimación del RG y RTI, de distintos genotipos de una especie, es mejor utilizar concentraciones bajas en los ensayos de laboratorio (Hede col. 2001) de esta manera las raíces tendrán la oportunidad de crecer después del tratamiento.

La evaluación de la tolerancia al aluminio en cultivo de tejidos puede ser útil para programas de mejora, debido a que la selección es más temprana y más rápida que en condiciones de campo. El cribado para evaluar diferentes genotipos de callos bajo condiciones ácidas y a distintas concentraciones de aluminio también se usa para identificar plantas tolerantes, sin embargo, se cuestiona su fiabilidad económica en algunas especies. Los cultivos de tejidos también se emplean para generar mutantes sensibles al estrés por Al procedentes de germoplasmas tolerantes con el fin de identificar y caracterizar genes involucrados en la tolerancia al aluminio (Dharmendra y col. 2011). Se han obtenido plantas tolerantes a partir de callos somáticos y cultivos de células inmaduras. La inducción de variantes somaclonales en cultivos de tejidos se ha usado para mejorar la tolerancia al aluminio en arroz, trigo, tomate y muchos otros cultivos. (Karsai y col. 1994, Dharmendra y col. 2011). En la especie modelo *Arabidopsis thaliana* se han hecho varios estudios de genes candidatos a la tolerancia al aluminio comparando el crecimiento de la raíz en mutantes “knockout” usando medios sólidos de agar con tratamientos con y sin aluminio (Hoekenga y col. 2006; Yang y col. 2011).



2. Tolerancia al aluminio

Los mecanismos de tolerancia al estrés por Al suelen clasificarse en dos categorías: los que impiden la entrada o excluyen el Al del ápice de la raíz (mecanismos apoplásticos) y aquellos en que la planta tolera la acumulación de Al o bien hay una detoxificación interna en el simplasma de la raíz y la hoja (mecanismos simplásticos) (Kochian 1995, Kochian y col. 2004). En los mecanismos simplásticos, el Al entra en el citoplasma y es detoxificado dentro de la célula formando complejos con componentes orgánicos (Kochian 1995). Existen diferentes compuestos que pueden formar complejos estables con Al dentro de la célula, entre ellos los ácidos orgánicos tales como cítrico, oxálico y málico (Foy 1988, Taylor 1988, Ma y Miyasaka, 1998) y las proteínas (Suhayda y Haug, 1985, Aniol 1984, Picton y col. 1991, Rincón y González 1991, Delhaize y col. 1991, Basu y col. 1994). El ión Al^{3+} libre o los complejos de Al quelados se transportan a las vacuolas donde se almacenan sin producir efectos tóxicos (Kochian y col. 2004). Entre los mecanismos de exclusión del Al vía apoplástica se han descrito los siguientes: liberación de componentes fenólicos (Ofei-Manu y col. 2001), formación de mucílago (Miyasaka y Hawes 2001, Cai y col. 2011), incremento del pH en la rizósfera (Degenhardt y col. 1998, Mugwira y Patel 1977) y exudación de ácidos orgánicos (Delhaize y col. 1993, Pellet y col. 1995, Sasaki y col. 2004, Magalhaes y col. 2007). Las raíces de diferentes especies vegetales secretan ácidos orgánicos en respuesta al estrés por Al, dichos ácidos se exudan mediante proteínas transportadoras de membrana y, posteriormente, forman complejos con Al, eliminando su efecto tóxico. Uno de los mecanismos de tolerancia al estrés por Al más estudiado es la exudación de ácidos orgánicos.

2.1. Exudación de ácidos orgánicos desde la raíz

El estrés por Al induce en las raíces la exudación de ácidos orgánicos principalmente cítrico, oxálico y málico que forman fuertes complejos con Al^{3+} protegiendo la raíz de la planta. Este mecanismo de tolerancia es el mejor documentado en plantas superiores. Los estudios fisiológicos han puesto de manifiesto que la mayoría de las especies de gramíneas comparten un mecanismo común de tolerancia consistente en la secreción de ácidos orgánicos por las raíces en respuesta al Al (Ma y col. 2001). La primera evidencia de secreción de malato inducida por Al se obtuvo trabajando con trigo (*Triticum aestivum*) (Kitagawa y col. 1986, Delhaize 1993), posteriormente se ha observado que las raíces de cultivares tolerantes de diferentes especies vegetales secretan altos niveles de cítrico, málico y/o oxálico cuando se tratan con Al. Algunas de estas especies son cebada (*Hordeum vulgare*) (Zhao y col. 2003), maíz (*Zea mays*) (Pellet y col. 1995, Kollmeier y col. 2001), alforfón (*Fagopyrum esculentum*) (Zheng y col. 1998), centeno (*Secale cereale*) (Li y col. 2000), soja (*Glycine max*) (Yang y col. 2000), sorgo (*Sorghum bicolor*) (Magalhaes y col. 2007; Kochian y col. 2005) y triticale (\times Triticosecale Wittmack) (Ma y col. 2000).

Hay dos modelos diferentes de secreción de ácidos orgánicos descritos por Ma (2000) y Ma y col. (2001). En el “patrón tipo I” (constitutivo) la exudación de ácidos orgánicos comienza inmediatamente después (pocos minutos) de la exposición al aluminio. Algunos representantes de este patrón son cebada y trigo que exudan cítrico y málico, respectivamente. Esta exudación rápida sugiere que el aluminio activa un mecanismo preexistente que no necesita la inducción de nuevas proteínas. Por otro lado, centeno, sorgo, arroz y maíz presentan el “patrón tipo II” (inducible) en la cual la exudación de ácidos orgánicos comienza varias horas después de la exposición al aluminio. El retraso en la exudación observado en el modelo de tipo II parece indicar que se necesita la inducción de proteínas que podrían estar implicadas en el metabolismo o en el transporte y exudación de ácidos orgánicos (Figura 4). Estas diferencias son consistentes con los modelos de expresión de genes involucrados en la tolerancia al aluminio (Ma 2000, Ma y Col. 2001). En la tabla 1 se detallan los ácidos orgánicos y el tipo de patrón de exudación de diferentes especies.

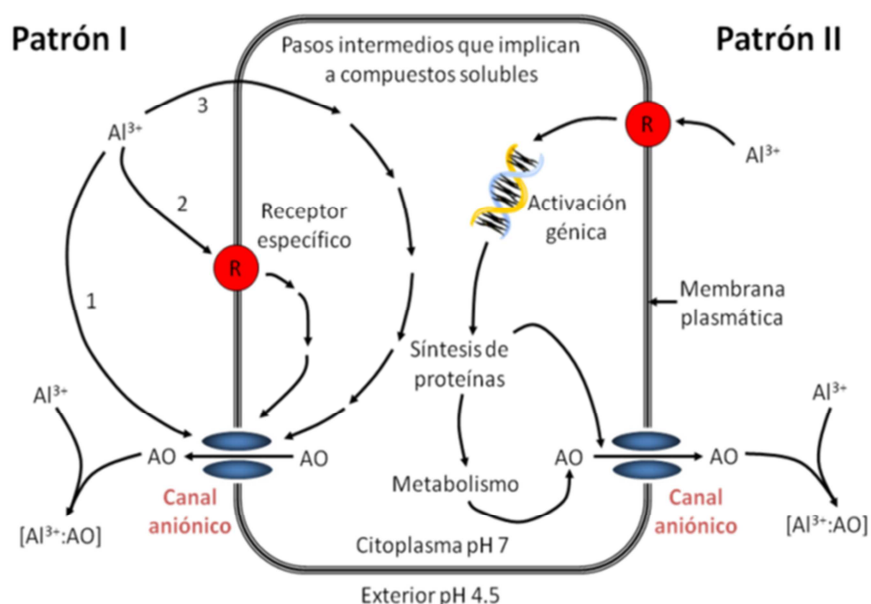


Figura 4. Patrones de exudación de ácidos orgánicos descritos en plantas. Patrón I (constitutivo) en el que la exudación comienza de forma inmediata y Patrón II (inducible) en el que la exudación se inicia varias horas después de la exposición al estrés por Al. Modificada de Ma y col. 2001.



Tabla 1. Tipos de ácidos orgánicos (AO) exudados por las raíces y modelo de exudación de diferentes especies vegetales en respuesta al estrés por Al.

Espece Vegetal	Ácido orgánico	Modelo	Referencia
<i>Acacia manginun</i>	Citrato	Sin/Inf.	Osawa y Kojima 2006
<i>Acacia auriculiformis</i>	Oxalato, citrato	Sin/Inf.	Nguyen y col. 2003
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Citrato, malato	Sin/Inf.	Hoekenga y col. 2003 Liu y col. 2009
<i>Hordeum vulgare</i>	Citrato	I	Zhao y col 2003
<i>Fagopyru esculentum</i>	Oxalato	I	Zheng y col. 1998
<i>Cassia tora</i>	Citrato	II	Ishikawa y col. 2000
<i>Citrus Grandis</i>	Citrato, malato	I	Yang y col 2011d
<i>Citrus sinensis</i>	Citrato, malato	I	Yang y col 2011d
<i>Citrus junos</i>	Citrato	II	Deng y col. 2009
<i>Deschampsia flexuosa</i>	Malato	Sin/Inf.	Schöttelndreier y col. 2001
<i>Eucalyptus camaldulensis</i>	Oxalato, citrato	Sin/Inf.	Nguyen y col. 2003
<i>Galium saxatile</i>	Citrato	Sin/Inf.	Schöttelndreier y col. 2001
<i>Lespedeza bicolor</i>	Citrato, malato	II	Dong y col. 2008
<i>Zea mays</i>	Citrato, malato	Sin/Inf.	Kollmeier y col. 2001
<i>Zea mays</i>	Oxalato	Sin/Inf.	Kidd y col. 2001
<i>Melaleuca cajuputi</i>	Oxalato, citrato	Sin/Inf.	Nguyen y col. 2003
<i>Melaleuca leucadendra</i>	Oxalato, citrato	Sin/Inf.	Nguyen y col. 2003
<i>Avena sativum</i>	Citrato, malato	Sin/Inf.	Zheng y col. 1998
<i>Oryza glaberrima</i>	Citrato	Sin/Inf.	Ishikawa y col. 2000
<i>Pisum sativum</i>	Citrato	Sin/Inf.	Ishikawa y col. 2000
<i>Populus tremula</i>	Oxalato, citrato	Sin/Inf.	Qin y col. 2007
<i>Raphanus sativus</i>	Citrato, malato	Sin/Inf.	Zheng y col. 1998
<i>Brassica napus</i>	Citrato, malato	Sin/Inf.	Zheng y col. 1998
<i>Oryza sativa</i>	Citrato	Sin/Inf.	Ishikawa y col. 2000
<i>Oryza sativa</i>	Oxalato	Sin/Inf.	Begum y col. 2009
<i>Viga umbellata</i>	Citrato	II	Yang y col. 2006
<i>Secale cereale</i>	Citrato, malato	II	Li y col 2000
<i>Rumex acetosella</i>	Oxalato	Sin/Inf.	Schöttelndreier y col. 2001
<i>Phaseolus vulgaris</i>	Citrato	Sin/Inf.	Miyasaka y col. 1991
<i>Glycine max</i>	Citrato, malato	II	Liao y col. 2006
<i>Glycine max</i>	Citrato	II	You y col. 2010
<i>Sorghum bicolor</i>	Citrato, malato	Sin/Inf.	Magalhaes y col. 2007
<i>Spinacia oleracea</i>	Oxalato	I	Yang y col. 2005
<i>Stylosanthes spp.</i>	Citrato	II	Li y col. 2009
<i>Helianthus annuus</i>	Citrato, malato	Sin/Inf.	Saber y col. 1999
<i>Colocasia esculenta</i>	Oxalato	Sin/Inf.	Ma y Miyasaka 1998
<i>Lycopersicon esculentum</i>	Oxalato	I	Yang y col. 2011b
<i>Triticosecale Wittmack</i>	Citrato, malato	II	Ma y col. 2000
<i>Viscaria vulgaris</i>	Oxalato	Sin/Inf.	Schöttelndreier y col. 2001
<i>Triticum aestivum</i>	Citrato, malato	I	Delhaize y col. 1993, Ryan y col. 2009

2.2. Genes involucrados en la tolerancia al aluminio

Los estudios genéticos de los últimos 30 años han establecido que la tolerancia al aluminio en muchas especies de cereales está controlada por muchos loci (Aniol y Gustafson 1984, Luo y Dvorak 1996, Papernik y col. 2001, Garvin y Carver 2003, Magalhaes y col. 2004, Ryan y col. 2009, Shi y col. 2009). Sin embargo, uno o dos loci pueden explicar la mayoría de la variación fenotípica en algunas descendencias y poblaciones (Luo y Dvorak 1996, Reide y Anderson 1996, Garvin y Carver 2003, Ma y col. 2004, Raman y col. 2005, Wang y col. 2007). Por ejemplo, en cebada (Ma y col. 2004, Furukawa y col. 2007), trigo (Aniol 1990), sorgo (Magalhaes y col. 2004, 2007) y avena (Nava y col. 2006) la tolerancia al estrés por Al está controlada en gran parte por un único gen dominante, mientras que en maíz (Pandey y col. 1994, Borrero y col. 1995, Ninamango-Cárdenas y col. 2003, Krill y col. 2010) y arroz (Wu y col. 2000, Ma y col. 2002, Nguyen y col. 2001, 2003) la tolerancia está controlada por múltiples loci. Desde la identificación del primer gen de tolerancia al estrés por Al (*ALMT1*) en trigo (Sasaki y col. 2004), se han encontrado otros genes involucrados en la tolerancia en diferentes especies de gramíneas usando distintos métodos, la mayoría de ellos relacionados con la secreción de ácidos orgánicos (Ma y col. 2014). También se han detectado genes implicados en el transporte y exudación de ácidos orgánicos que confieren tolerancia en especies de dicotiledóneas.

2.2.1. Genes de la Familia *ALMT* y *MATE*

Hasta la fecha se han identificado dos proteínas transportadoras de membrana relacionadas con la secreción de ácidos orgánicos (AO) por la raíz en plantas tratadas con Al, una proteína transportadora de malato activada por Al (*ALMT*, Al-activated malate transporter) y una proteína de la familia de transportadores para la extrusión de componentes tóxicos y múltiples drogas (*MATE/AACT*, multidrug and toxic compounds extrusion/Aluminum activated citrate transporter) (Delhaize y col. 2012, Ma y col. 2014) que es una proteína transportadora de citrato activada por Al.

En 2004, Sasaki y col. fueron los primeros en aislar el gen de la proteína transportadora (*TaALMT1*) responsable de la secreción de malato en trigo (Figura 5). Estudios electrofisiológicos demostraron en células de raíz la función del transportador *TaALMT1* como un canal de aniones que facilita la secreción de malato a través de la membrana plasmática (Zhang y col. 2001, Yamaguchi y col. 2005, Piñeros y col. 2008). Además, la identificación del gen *TaALMT1* de trigo ha permitido detectar genes ortólogos candidatos de tolerancia al estrés por Al en otras especies, los genes *BnALMT1* y *BnALMT2* en *Brassica napus* (Ligaba y col. 2006), el gen *AtALMT1* en *Arabidopsis thaliana* (Hoekenga y col. 2006), el gen *ScALMT1* en centeno (*Secale cereale*) (Fontecha y col. 2007; Collins y col. 2008), los genes *ZmALMT1* y *ZmALMT2* en maíz (*Zea mays*) (Piñeros y col. 2008, Ligaba y col. 2012), el gen *HvALMT1* en cebada (*Hordeum vulgare*) (Gruber y col. 2010) y el gen *HIALMT1* en *Holcus lanatus* (Chen y col. 2013). Sin embargo, los genes *ZmALMT1*, *ZmALMT2* y *HvALMT1* no están directamente involucrados en la secreción de malato (Ma y col. 2014).



En el año 2007 se aislaron otros dos genes miembros de una familia transportadora que codifican transportadores de citrato (la familia *MATE*), el gen *HvAACT1* o *HvMATE1* en cebada (Furukawa y col. 2007, Wang y col. 2007) y el gen *SbMATE* en sorgo (Figura 5) (Magalhaes y col. 2007). La familia de las proteínas transportadoras *MATE* comprende un grupo extenso y diverso presente en bacterias, hongos, plantas y mamíferos. Estas proteínas parecen funcionar como transportadores secundarios para eliminar pequeños compuestos orgánicos desde el citosol (Ryan y col. 2011). Las proteínas *MATE* pueden desempeñar un papel en la tolerancia al estrés por Al ya que pueden transportar sustratos como citrato. A partir de los genes *HvMATE1* y *SbMATE* varios trabajos han identificado genes ortólogos involucrados en la secreción de citrato activada por Al, el gen *AtMATE* en la especie modelo *A. thaliana* (Liu y col. 2009), los genes *ScMATE1* (*ScFRDL1*) y *ScFRDL2* en centeno (Yokosho y col. 2010, Silva-Navas y col. 2012), el gen *ZmMATE1* en maíz (Maron y col. 2010), el gen *OsFRDL4* en arroz (Yokosho y col. 2011), el gen *VuMATE* en frijol arroz (*Vigna umbellata*) (Yang y col. 2011c) y el gen *TaMATE1B* en trigo (Tovkach y col. 2013, García-Oliveira y col. 2013).

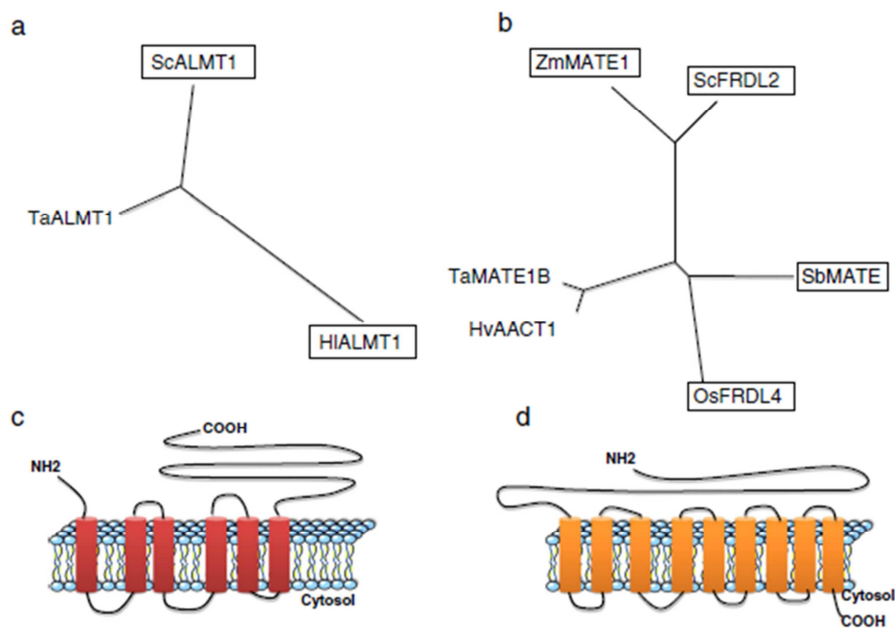


Figura 5. Árbol filogenético de proteínas ALMT de tres especies distintas de gramíneas (a) y árbol filogenético de proteínas MATE de seis especies distintas de gramíneas (b). Diagrama que representa la estructura secundaria de las proteínas ALMT (c) y MATE (d) en la membrana plasmática. Fuente Ma y col. 2014



Se ha demostrado en diversas especies que los genes *MATE* están involucrados en la detoxificación provocada por la toxicidad del Al. La expresión de heterólogos de *SbMATE* en plantas de *Arabidopsis*, de *HvAACT1* en oocitos de *Xenopus* y en plantas de tabaco ha demostrado que codifican proteínas transportadoras que facilitan la exudación de citrato activada por Al (Furukawa y col. 2007, Magalhaes y col. 2007).

La mayoría de los genes *ALMT* y *MATE* se expresan en la punta de la raíz. Por ejemplo, el gen *TaALMT1* se expresa intensamente en los últimos 5 mm de la punta de la raíz (Sasaki y col. 2004), también se ha observado una alta expresión en los primeros 3 mm de raíces de cebada (Fujii y col. 2012). Hay que recordar que el primer sitio de toxicidad por aluminio es la punta de las raíces, por lo tanto, una alta expresión en esta posición otorgaría una eficiente detoxificación del Al externo (Ryan y col. 1993). Algunos estudios también han demostrado la localización de la expresión de estos genes. En cebada la expresión del gen *HvMATE1* se localiza en las células epidérmicas de las raíces (Furukawa y col. 2007) y recientemente, la expresión del gen *SbMATE* de sorgo se ha localizado en capas celulares de la epidermis y en la región cortical de las raíces (Sivaguru y col. 2013).

Un aspecto interesante de la participación de las proteínas *ALMT* y *MATE* en la tolerancia al estrés por Al es la función de transporte que cumplen y, en particular, el requerimiento de la presencia de Al^{3+} para activar su función. Las proteínas *ALMT1* de trigo, centeno, *Arabidopsis* y *Brassica napus* y, las proteínas *MATE* de sorgo y cebada requieren de Al^{3+} externo para inducir su actividad de transporte (Ryan y col. 2011). Sin embargo, los mecanismos que subyacen la activación de las proteínas transmembrana (*ALMT* y *MATE*) aún no se conocen. La proteína *ALMT1* contiene seis dominios transmembrana con los extremos terminales amino y carboxilo localizados en el exterior de la membrana plasmática (Motoda y col. 2007). Furuichi y col. (2010) han identificado tres residuos (Glu274, Asp275 y Glu284) en el dominio C-terminal de *TaALMT1* involucrados en la activación mediante la unión directa al Al. Sin embargo, otros estudios, más recientes, han demostrado que el dominio N-terminal también puede mediar en el transporte de ácidos orgánicos en ausencia del dominio C-terminal (Ligaba y col. 2013). Además, un análisis filogenético ha mostrado que los tres residuos de la región C-terminal están altamente conservados en la familia *ALMT*, en la cual algunos miembros no muestran activación por Al (Ma y col. 2014).

Se han observado diferentes modelos de expresión de los genes que transportan AO en las raíces de distintas especies vegetales. La expresión de los transcritos de los genes *TaALMT1* (Sasaki y col. 2004) y *HvAACT1* (Furukawa y col. 2007) no se induce con el tratamiento de Al, mientras que *ScALMT1* (Fontecha y col. 2007, Collins y col. 2008), *ScFRDL2* (Yokosho y col. 2010), *SbMATE* (Magalhaes y col. 2007), *OsFRDL4* (Yokosho y col. 2011) y *HIALMT1* (Chen y col. 2013) son fuertemente inducidos por Al, dentro de estos últimos hay distintos tiempos de inducción después de la exposición al estrés por Al. La expresión de *ScALMT1* y *OsFRDL4* se produce algunas horas después de la exposición, mientras que la expresión de *SbMATE* requiere algunos días (Collins y col. 2008, Yokosho y col. 2011, Magalhaes y col. 2007). Los



modelos de expresión están asociados consistentemente con la secreción de los AO, las especies de plantas que tiene una rápida secreción AO con “patrón tipo I” no requieren la inducción del gen, mientras que los genes que se inducen pertenecen a las especies de plantas del “patrón tipo II” que retrasan la secreción de AO (Ma y col. 2014).

Se ha demostrado mediante la obtención de plantas “knockout” y “knockdown” para genes de *ALMT* y *MATE* la disminución de la tolerancia al estrés por Al (Ma y col. 2014), incluso en algunos casos la sobreexpresión de estos genes incrementa la tolerancia (Figura 6) (Delhaize y col. 2004, 2009, Pereira y col. 2010, Zhou y col. 2013, Schroeder y col. 2013). El ejemplo más notable hasta la fecha ha sido la sobreexpresión de *TaALMT1* en cebada, trigo y *Arabidopsis*, estas plantas transgénicas han mostrado un mayor crecimiento relativo de la raíz de 20, 8 y 4 veces con respecto a las control, respectivamente (Figura 6)(Delhaize y col. 2004, Pereira y col. 2010, Ryan y col. 2011).

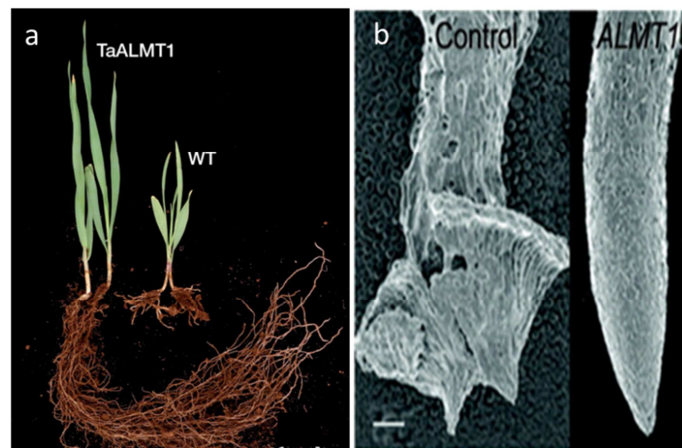


Figura 6. En la fotografía “a” se observan dos plántulas de cebada crecidas en suelo ácido que contiene una alta concentración de aluminio, en la misma fotografía la plántula de la izquierda ha sido genéticamente modificada con el gen de trigo *TaALMT1*, mientras que la otra plántula a la derecha es un parental silvestre no transgénico (WT). En la fotografía “b” se observa una imagen al microscopio donde se destaca la morfología de dos ápices de raíces de plántulas de cebada tratadas con Al (3 μ M), una línea control (con el vector vacío) y una línea transgénica con el gen *TaALMT1*. Fuente: Schroeder y col. (2013), Delhaize y col. (2004)

Varios trabajos han demostrado la contribución de algunos genes a la tolerancia al aluminio a partir de la segregación y análisis funcional en diferentes tipos de descendencias. En estos trabajos se observa variación natural para genes de tolerancia y los genes implicados son los siguientes: *TaALMT1*, *AtALMT1*, *SbMATE*, *HVAECT1*, *ScALMT1*, *ZmMATE1* y *TaMATE1B* (Sasaki y col. 2004, Hoekenga y col. 2006, Magalhaes y col. 2007, Furukawa y col. 2007, Collins y col. 2008, Maron y col. 2010, Tovkach y col. 2013). Por otro lado, hay genes que contribuyen a la tolerancia al aluminio pero que no muestran variación natural para la tolerancia. Por ejemplo,



el gen *AtMATE* de *Arabidopsis* se detectó mediante análisis mutacional (Liu y col. 2009). Un tercer grupo lo constituyen los genes que contribuyen a la tolerancia y se han detectado a través de estudios basados en segregación u homología, por ejemplo los genes *BnALMT1*, *BnALMT2* de *Brassica* y *ScMATE1* y *ScMATE2* de centeno (Ligaba y col. 2006, Yokosho y col. 2010, Silva-Navas y col. 2012).

2.2.1.1. Mecanismos de regulación de la expresión de los genes *ALMT* y *MATE*

En general en especies de gramíneas la cantidad de mensajeros y la expresión de los genes *ALMT* y *MATE* es mayor en cultivares tolerantes que en cultivares sensibles al estrés por Al, indicando que los niveles de expresión de estos genes podrían estar regulando la tolerancia (Ma y col. 2014). Algunos estudios han puesto de manifiesto los cambios a nivel molecular que regulan la expresión de los genes *ALMT* y *MATE*, como el incremento de elementos repetitivos en tándem, incremento del número de copias, inserción de un transposón y alteración de elementos reguladores en *cis* (Delhaize y col. 2012).

El promotor de *TaALMT1* de trigo es altamente polimórfico con ocho alelos diferentes descritos hasta la fecha, estos alelos comprenden polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) y repeticiones perfectas en tándem de varios tamaños. Los altos niveles de expresión del gen *ALMT1* están asociados con elementos repetitivos en tándem en la región promotora de la mayoría de las líneas tolerantes, como sucede en el cultivar Atlas 66 (Figura 7a) (Sasaki y col. 2006, Ryan y col. 2010). En la región aguas arriba ("upstream") del gen *SbMATE* de sorgo se ha encontrado un elemento transponible con secuencias invertidas en miniatura (MITE), el MITE "tourist-like", estando el número de esas repeticiones correlacionado con los niveles de expresión de *SbMATE*. La línea tolerante SC283 con seis MITEs en tándem tiene un mayor nivel de expresión del gen *SbMATE*, mientras que la línea sensible Tx430, con sólo un MITE, tiene un menor nivel de expresión (Figura 7a) (Magalhaes y col. 2007).

Por otro lado, en centeno la alta tolerancia al estrés por Al se ha relacionado con el incremento del número de copias del gen *ScALMT1*. El genotipo de centeno tolerante (M39A-1-6) tiene cinco copias del gen *ScALMT1* que constituyen un "cluster" en el brazo corto del cromosoma 7R, de estas, dos copias se expresan intensamente en la punta de la raíz. El genotipo sensible (M77A-1) tiene dos copias formando un "cluster" y sólo una tiene una alta expresión (Figura 7b) (Collins y col. 2008). Sin embargo, la relación entre mayor tolerancia y mayor número de copias del gen *ScALMT1* en centeno no está clara, ya que otro estudio realizado por Fontecha col. (2007) ha demostrado que una línea sensible de centeno (Riodeva) tiene 5 copias del gen, mientras que el cultivar tolerante (Ailés) tiene solamente una. Hace poco Maron y col. (2013) han encontrado que los cultivares de maíz tolerantes al estrés por Al (Al237, C100-6 y IL677a) tienen tres copias del gen *ZmMATE1* idénticas que son parte de una triplicación en tándem, asociando estas copias triplicadas con una alta expresión del gen y una mayor tolerancia (Figura 7b).



En cultivares de cebada y trigo se han encontrado algunas inserciones de transposones que estarían regulando los niveles de expresión de genes MATE. En cebada, en cultivares tolerantes se ha encontrado una inserción de 1 kb (transposón “CACTA-like”) en la región 5' UTR del gen *HvAACT1*, esta inserción funciona como un “enhancer” aumentando la expresión y alterando la ubicación de la expresión en la punta de las raíces (Figura 7c) (Fujii y col. 2012). Recientemente, en trigo se ha localizado, a 25 pb antes del codón de inicio del gen *TaMATE1B*, un elemento transponible de 11,1 kb (transposón “Sukkula-like”) cuya presencia aumenta la expresión en el ápice de la raíz en cultivares de trigo tolerantes (Carazinho), secretando citrato de forma constitutiva (Figura 7c) (Tovkach y col. 2013). En *Holcus lanatus* se ha observado una alta expresión del gen *HLALMT1* en cultivares tolerantes debido al incremento de elementos reguladores en cis en la región promotora a los cuales se une el factor de transcripción *ART1* (Figura 7d) (Chen y col. 2013).

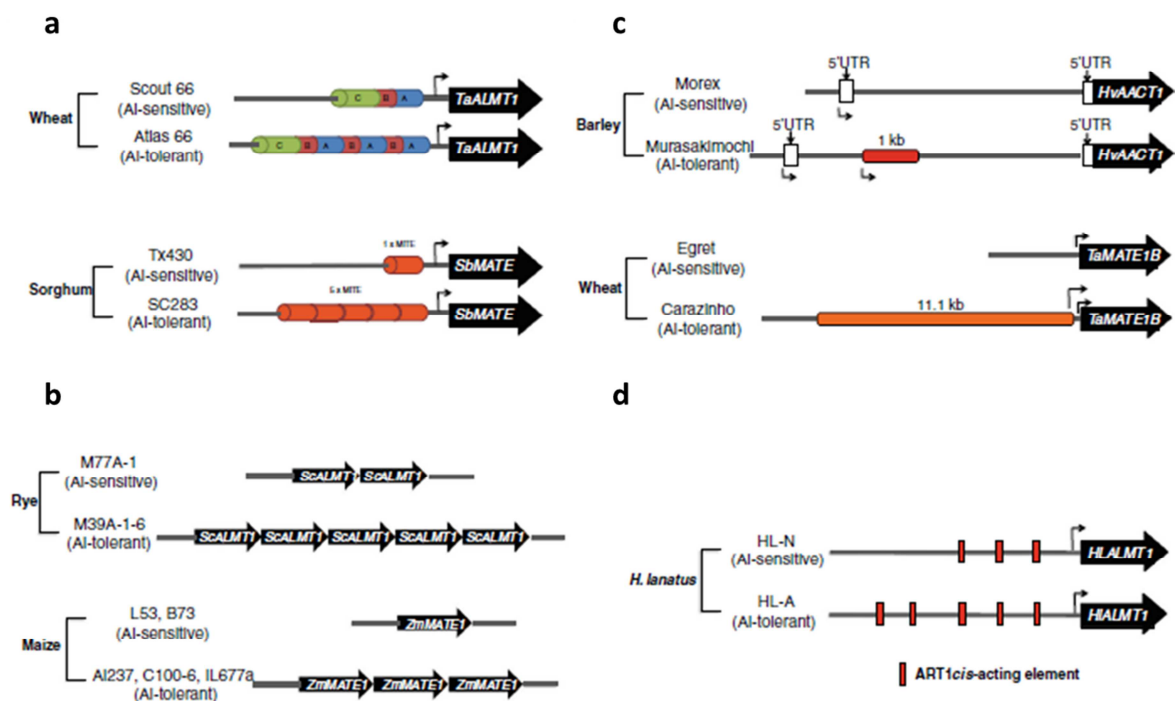


Figura 7. Diferentes mecanismos de regulación de genes de tolerancia al estrés por AI involucrados en la secreción de ácidos orgánicos. El alto nivel de expresión se debe al incremento de elementos repetitivos en tándem (a), el incremento del número de copias del gen (b), la inserción de un transposón (c) o la alteración de elementos reguladores en cis (d). Fuente: Ma y col. (2014)

2.2.2. Influencia del Al en la actividad de enzimas del metabolismo de los ácidos orgánicos

La actividad de las enzimas y la expresión de los genes implicados en la cadena de transporte de electrones y en el ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA) cambia cuando las plantas se someten a estrés. Existen ejemplos de alteración de la actividad enzimática de las enzimas que intervienen en el transporte de electrones en la mitocondria por estrés con Al en diferentes especies de microorganismos, plantas y animales (Efraín Ramírez Benítez y col. 2008; Kumari y col. 2008; Mailloux y col. 2008).

Varios estudios han demostrado que un aumento de la actividad o concentración de algunas enzimas implicadas en el metabolismo de los AO produce una mayor secreción de AO desde la raíz (Figura 8). Ligaba y col. (2004) han demostrado que en las raíces de colza tratadas con Al aumentan la actividad de la citrato sintasa (CS), malato deshidrogenasa (MDH), fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPC) y las concentraciones de citrato y malato, concluyendo que la acumulación del Al y la subsecuente secreción de citrato y malato estaban asociadas al incremento de la biosíntesis, pero a la vez hubo una baja tasa de respiración. En la especie arbórea, *Paraserianthes falcataria*, aumenta la acumulación y secreción de citrato activada por Al, acompañada de un incremento de la actividad y un aumento de la expresión de la CS mitocondrial, indicando que el incremento de la cantidad y secreción de citrato se produce en respuesta al estrés por Al y en parte se debe a un aumento de la actividad de CS (Osawa y Kojima 2006).

En ápices de raíces de *Cassia tora* los tratamientos con Al incrementan la actividad de la CS pero disminuyen la actividad de aconitasa (ACO), sin embargo, a pesar de la disminución de esta última actividad enzimática, aumentó la cantidad y secreción de citrato. Por otro lado, las actividades de la isocitrato deshidrogenasa dependiente de NADP (NADP-IDH), MDH y PEPC no sufrieron cambios por el Al. En *Cassia tora* se piensa que la regulación de la actividad de la CS y ACO por Al puede ser responsable de la secreción y acumulación de citrato (Yang y col. 2004).

La actividad de la CS se incrementó un 16% en ápices de raíces de soja al exponerlas a tratamientos con Al, sin embargo, la actividad de la PEPC y NADP-IDH y los niveles de concentración de citrato no se modificaron. Los autores han sugerido que el incremento de la actividad de CS inducido por Al aumenta la secreción de citrato y que la pobre variación de la concentración de citrato se debió a un balance entre la síntesis de citrato y su posterior secreción (Yang y col. 2001). Por otro lado, en ápices de raíces de centeno la actividad de la CS se incrementó un 30% al exponerlas al estrés por Al, siendo al parecer este incremento responsable del aumento de la secreción de citrato por la raíz (Li y col. 2000).

Teniendo en cuenta estos resultados, es razonable pensar que la alteración del metabolismo de los AO puede estar relacionada con la secreción de AO inducida por Al. Sin embargo, no es obvio que el simple aumento de los niveles internos de los AO conduzca a un aumento de las secreciones, ya que otros estudios basados en actividad enzimática no dan crédito a los



cambios del metabolismo de AO que aumentan la actividad o concentraciones de las enzimas para luego obtener una óptima secreción de AO desde la raíz. Por ejemplo, los genotipos de trigo tolerantes y sensibles al aluminio no difieren en sus concentraciones internas de malato, aunque las variedades resistentes exudan 10 veces más malato que las sensibles (Delhaize y col. 1993). De forma semejante, Gaume y col. (2001) han demostrado que un cultivar de maíz tolerante al estrés por Al que tenía una alta concentración de AO y una alta secreción de AO (citrato, malato y succinato) comparado con un cultivar sensible, no tenía una secreción proporcional de acuerdo a la alta concentración de los AO en las raíces. La concentración interna de citrato, malato y succinato en las raíces de ambos cultivares aumentó solo de 2 a 4 veces, mientras que la secreción de estos ácidos aumentó de 2 a 20 veces. Sugiriendo que la secreción de AO puede estar mediada por transportadores que se activan o se inducen por el Al.

Líneas de Triticale con diferentes grados de secreción de malato y citrato al tratarlas con Al, una más tolerante que la otra, muestran un incremento similar de las concentraciones de citrato y malato en la raíz en respuesta al Al. De hecho los cambios de la actividad de las enzimas CS, PEPC, MDH y NADP-IDH fueron similares tanto en las raíces de las líneas tolerantes como sensibles, sugiriendo que la secreción de malato y citrato no está regulada por mecanismos internos de la raíz o por la capacidad de la raíz para sintetizarlos (Hayes y Ma 2003).

Otros trabajos en *Amaranth spp*, en espinaca y tomate han demostrado que la concentración de oxalato está relacionada con la secreción de algunos acumuladores de oxalato (Yang y col. 2008). Además, en dos especies de *Citrus* se ha demostrado que la secreción de citrato y malato no está relacionada con los niveles internos de concentración de estos AO en la raíz (Yang y col 2012, Chen y col. 2009).

Varios estudios con plantas y células transgénicas han suministrado evidencias adicionales que podrían contribuir al entendimiento del metabolismo de los AO en relación con la secreción de ácidos orgánicos y la tolerancia al estrés por Al. En dichos estudios se ha observado un aumento de la tolerancia al estrés por Al y un aumento de la secreción de citrato y/o malato en plantas transgénicas sobre-expresando algún gen implicado en el metabolismo de los AO. Entre ellos se pueden enumerar algunos trabajos con plantas de tabaco y papaya sobre-expresando una CS de la bacteria *Pseudomonas aeruginosa* (De La Fuente y col. 1997); con plantas de colza (Anoop y col. 2003) y células de zanahoria (Koyama y col. 1999) sobre-expresando CS mitocondrial (CSm) de *A. thaliana*; con plantas de *Nicotiana Benthamiana* sobre-expresando CSm procedente de *Citrus junos* (Deng y col. 2009), con plantas de tabaco sobre-expresando un MDH citosólica (MDHc) de *A. thaliana*, una MDH de *Escherichia coli* (Wang y col. 2010) y una CSm de arroz (Han y col. 2009); y con plantas de tabaco sobre-expresando piruvato fosfatodiquinasa (PPDK) de *Mesembryanthemum crystallinum* (Trejo-Téllez y col. 2010).

Sin embargo, Delhaize y col. (2001) han observado que la sobre-expresión de una CS de *P. aeruginosa* en tabaco no aumenta la acumulación de citrato y la secreción a pesar de generar en la línea transgénica de tabaco hasta 100 veces más expresión de la proteína CS, contrastando este resultado con el obtenido previamente por De La Fuente y col. (1997). Es posible que los niveles de concentración de enzimas relacionadas con el metabolismo de los AO no sean una limitación para la tolerancia ya que en un trabajo de Delahize y col. (2004) se obtuvo una planta transgénica de cebada que sobre-expresaba el gen transportador *TaALMT1* de trigo y que era 20 veces más tolerante debido al aumento de la secreción de ácido málico, sin haber manipulado teóricamente ningún gen del metabolismo de los AO.

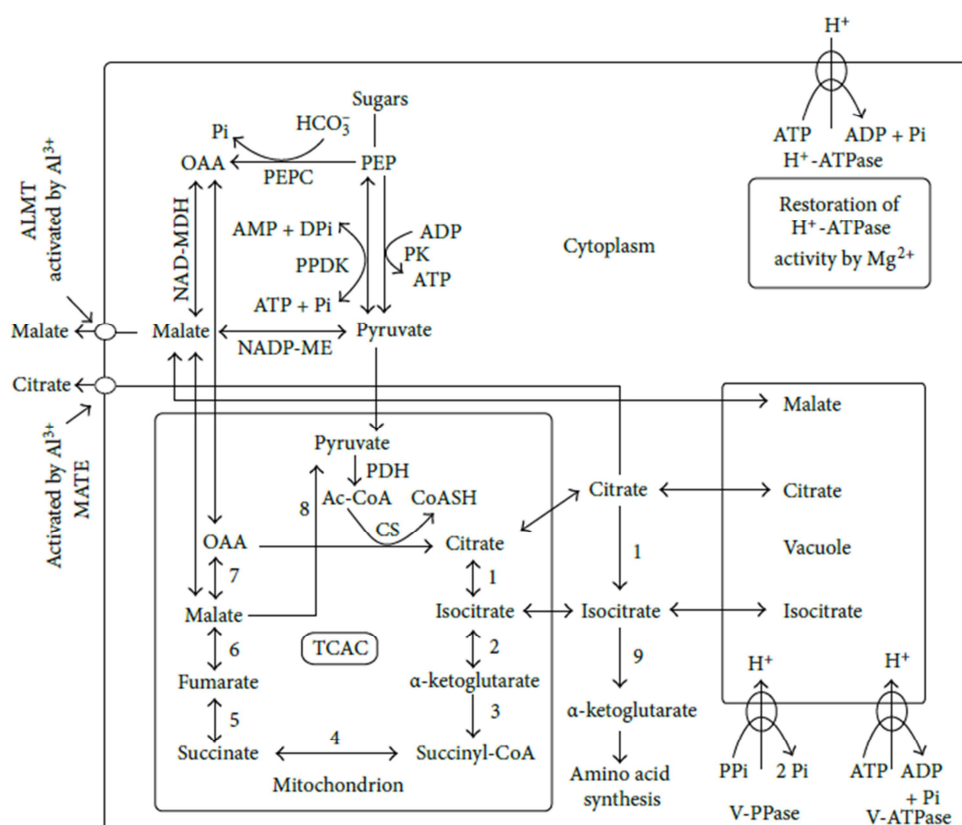


Figura 8. Diagrama que muestra los procesos y reacciones involucrados en la acumulación y secreción de ácidos orgánicos (AO) en plantas tratadas con Al. Ac-CoA: acetil-CoA; ALMT, transportador de malato activado por Al; CS: citrato sintasa; DPi: difosfato inorgánico; MATE: extrusión de componentes tóxicos y múltiples drogas; NAD-MDH: malato deshidrogenasa-NAD; NADP-ME: enzima málica-NADP; OAA: oxalacetato; PDH: piruvato deshidrogenasa; PEP: fosfoenolpiruvato; PEPCK: carboxilasa-PEP; Pi: fosfato; PK: piruvato quinasa; PPDCK: piruvato fosfatodiquinasa; PPI: pirofosfato inorgánico; TCAC: ciclo de ácido tricarboxílico; V-ATPase: adenosin trifosfato, tonoplasto; VPPase: pirofosfatasa, tonoplasto; 1: aconitasa (ACO); 2: isocitrato deshidrogenasa-NAD (NAD-IDH); 3: alfa cetoglutarato deshidrogenasa; 4: succinato tiociasa; 5: succinato deshidrogenasa; 6: fumarasa; 7: NAD-MDH; 8: enzima málica-NAD (NAD-ME); 9: NADP-IDH. Fuente: Yang y col. (2013).



2.2.3. Genes que están involucrados en la tolerancia al estrés por Al pero que no explican la variación natural observada para este carácter.

Otra serie de genes de tolerancia al estrés por Al se ha identificado mediante métodos de mutagénesis química de semillas y obtención y análisis de mutantes de T-DNA. Las plantas empleadas para desarrollar estos estudios de análisis mutacional fueron de arroz y *Arabidopsis*. Entre los cultivos de cereales, el arroz muestra una gran tolerancia al estrés por Al (Ma y col. 2002), sin embargo, la cantidad de citrato exudada por las raíces de arroz es considerablemente menor que la exudada por las raíces de centeno (Li y col. 2000, Collins y col. 2008). La tolerancia en arroz está controlada por múltiples loci (Wu col. 2000, Ma col. 2002, Nguyen col. 2001, 2003). Mediante mutantes, se han identificado, hasta el momento, dos factores de transcripción de la familia de dedos de zinc ("zinc finger") C2H2, uno en *Arabidopsis*, el factor de transcripción *AtSTOP1* ("sensitive to proton rhizotoxicity 1") (Iuchi y col. 2007) que regula la expresión de *AtMATE1* y *AtALMT1* (Liu y col. 2009) entre otros genes, y otro factor de transcripción en arroz, *ART1* ("Al resistance transcription factor 1") que también regula la expresión de genes relacionados con la tolerancia al estrés por Al en arroz (Yamaji y col. 2009, Sawaki y col. 2009). Hace poco se han identificado otros dos homólogos de esta familia de factores de transcripción (sin realizar un análisis mutacional), uno en *Holcus lanatus*, el gen *HLART1* que interactúa con la región promotora del gen *HLALMT1* (Chen y col. 2013) y, otro identificando en trigo los factores de transcripción *TaSTOP1* (García-Oliveira y col. 2013). En el caso los genes *TaSTOP1*, *ART1* y *AtSTOP1* los niveles de expresión de los transcritos correspondientes no se alteran por el tratamiento con Al, teniendo dichos genes una expresión de tipo constitutiva (García-Oliveira y col. 2013, Sawaki y col 2009, Liu y col. 2009).

Siguiendo con los análisis mutacionales, en arroz se ha encontrado un mutante sensible al Al, en el que no funcionaba el gen *STAR1* ("sensitive to Al rhizotoxicity"). En arroz existen dos genes *STAR* que interactúan, *OsSTAR1* y *OsSTAR2*, que codifican para un dominio de unión ATP y un dominio de unión a membrana, respectivamente. La proteína *OsSTAR1* interactúa con *OsSTAR2* que posee un dominio transmembrana procedente de la misma familia de transportadores ABC, ambos genes se expresan predominantemente en la raíz y se inducen por el tratamiento con Al. Los complejos STAR1-STAR2 se disponen en vesículas y pueden liberar UDP-glucosa al apoplasto por exocitosis, disminuyendo la acumulación de Al en la pared celular (Huang y col. 2009).

Otros estudios de análisis mutacional mediante la obtención de “knockout” de genes candidatos a la tolerancia al estrés por Al han demostrado un incremento de la sensibilidad al estrés por Al en plantas de arroz, estos genes son: *OsFRDL4* responsable de la secreción de citrato (Yokosho y col. 2011), *OsCDT3* que codifica un pequeño péptido que se une al Al y previene su entrada en las células de la raíz (Xia y col 2013), *OsMGT1* un transportador de Mg que podría aliviar la toxicidad de Al en el interior de la célula (Chen y col. 2012) y *OsNrnt1* un transportador de Al que detoxifica el Al^{3+} del apoplasto para llevarlo a la vacuola (Xia y col 2010). De todos estos genes sólo *OsFRDL4* muestra una buena correlación entre la expresión y la tolerancia al Al, mientras los demás genes (*OsCDT3*, *OsMGT1*, *OsNrnt1*) no mostraron correlación. En *Arabidopsis* se han identificado otros dos genes de tolerancia mediante análisis mutacional, *AtALS1* y *AtALS3*, que codifican proteínas transportadoras de la familia ABC (Larsen y col. 2005, 2007). La función de las proteínas *AtALS* es aún desconocida aunque se piensa que son proteínas transportadoras de Al, y *AtALS1* podría movilizar el Al^{3+} hacia la vacuola funcionando como un transportador del tonoplasto (Gabrielson y col. 2006).

Para todos estos genes no se ha detectado, hasta la fecha, variabilidad natural que explique las diferencias en los niveles de tolerancia que existen entre las plantas de las especies en las que se han identificado.

2.2.4. La pared celular, primer sitio de interacción con el Al

Una de las mayores preocupaciones por resolver en la mejora de plantas es evitar la inhibición del crecimiento y desarrollo de la raíz provocado por la toxicidad del Al en suelos ácidos (Delhaize y Ryan 1995). Como se ha visto anteriormente existen varias estrategias que utilizan las plantas para tolerar o resistir el aluminio, entre las más estudiadas están la quelación externa del Al mediante exudación de ácidos orgánicos, el incremento del pH en la rizósfera, la inmovilización del Al en la vacuola y la exclusión del aluminio del apoplasto (Taylor 1991, Kochian 1995), pero una de las teorías que recibe mayor atención, en los últimos trabajos, es la función que puede cumplir la pared celular en la tolerancia al aluminio. La pared celular de la raíz es el primer sitio de interacción con el Al^{3+} , por tanto, la estructura y composición de la pared celular puede jugar un papel importante en muchas de las situaciones de estrés ante las que se enfrenta una planta.

La pared celular es una estructura compleja macromolecular que protege a la célula, está compuesta de polisacáridos (celulosa y hemicelulosa) que están embebidos y reticulados por otros polímeros y pequeñas moléculas (lignina, pectinas y ácido ferúlico). La estructura formada por los polisacáridos, proteínas y compuestos aromáticos y alifáticos de la pared celular permite a las plantas sobrevivir en diferentes situaciones ambientales (Wu y col. 2013, Caffall y Mohnen 2009).



La pared primaria es más gruesa que la lámina media, se forma inmediatamente después de la división celular, antes de que la célula complete su crecimiento (Figura 9). La pared secundaria está presente sólo en algunos tipos celulares, es mucho más gruesa que la pared primaria, sigue a la pared primaria en orden de aparición (Figura 9) (Mauseth 2003). El tipo de hemicelulosa y otros componentes difieren significativamente entre gramíneas y dicotiledóneas (Vogel 2008).

Diferenciar la composición de la pared celular entre distintas especies puede ser complejo debido a que incluso entre dicotiledóneas y algunas plantas monocotiledóneas puede haber similitudes. De acuerdo con los trabajos realizados por Carpita y Gibeaut (1993) en diferentes especies vegetales, se han propuesto dos modelos distintos de pared primaria. Una pared primaria “Tipo I” representativa de todas las dicotiledóneas y algunas monocotiledóneas, y una pared primaria especial “Tipo II” de la familia Poaceae y de monocotiledóneas. Los mismos autores junto con otros trabajos mencionan que la pared celular “Tipo I” fundamentalmente tiene una red de microfibrillas de celulosa, polisacáridos Xiloglucanos (XGs) y una matrix de pectinas conformada por ácido poligalacturónico (PGAs) y ramnogalacturonano I (RG I), además de un RG II sintetizado en angiospermas, también tienen glicoproteínas ricas en hidroxiprolina (HRGPs) y proteínas ricas en prolina (PRP) para la extensión de la célula. La pared primaria “Tipo II” se compone de microfibrillas de celulosa igual que las del “Tipo I”, pero en lugar de XG, los principales polímeros que se entrelazan en células en división son glucurono-arabinoxilanos (GAXs), sin embargo, se pueden encontrar pequeñas cantidades de XG en el Tipo II; además, la pared “Tipo II” se compone de una matriz de pectinas PGAs y RGs y una mezcla de homopolímeros (1,4 y 1,3) β -D-glucanos (MLG) para la expansión celular (Carpita y Gibeaut 1993, Smith y Harris 1999).

Otra publicación realizada por Vogel (2008) ha detallado un poco más la constitución de la pared celular. La pared celular primaria de las gramíneas contiene glucurono-arabinoxilano, mezclas de glucanos (hemicelulosas), altos niveles de ácido ferulico y ácido p-cumarico, y una pequeña cantidad de pectinas y proteínas. Por otro lado, la pared celular primaria de las dicotiledóneas contiene xyloglucano, manano oligosacáridos, glucomananos (hemicelulosas) y altos niveles de pectinas y proteínas estructurales. La pared celular secundaria de gramíneas y dicotiledóneas está compuesta de celulosa, glucurono-arabinoxilano y lignina, sin embargo, la estructura de la glucurono-arabinoxilano difiere entre dicotiledóneas y gramíneas (Vogel 2008).

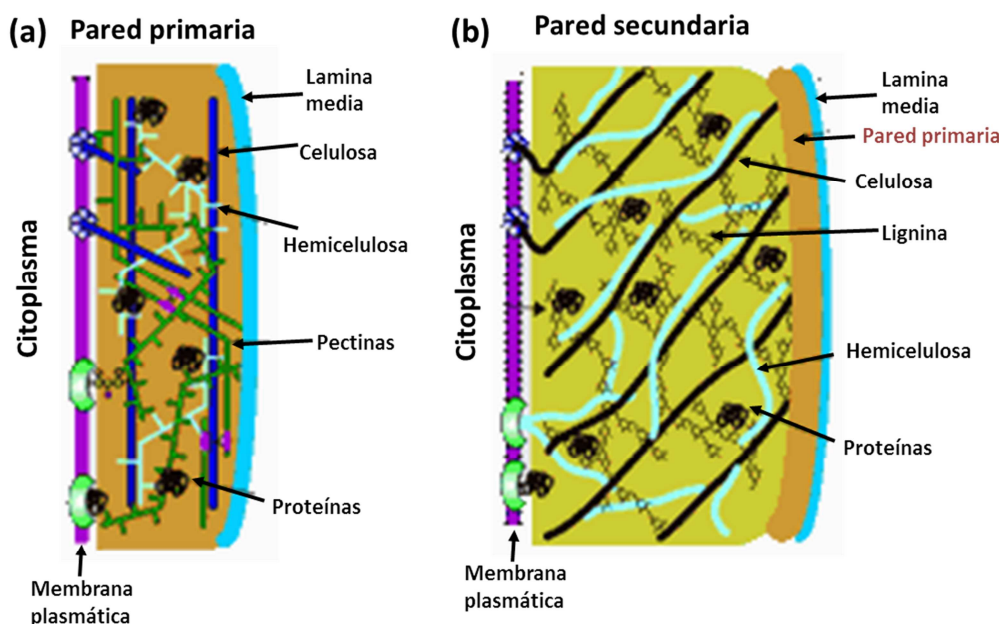


Figura 9. Representación esquemática de la pared celular de las plantas superiores. Pared primaria (a) y Pared secundaria (b) (adaptado de <http://bioenergy.crcr.uga.edu/People/people.htm>)

Las pectinas son los principales componentes de la lámina media y primaria de las paredes celulares vegetales en dicotiledóneas (suponen del 30-35% de la pared en peso seco), mientras que en las especies de la familia Poaceae se encuentran en menor cantidad (5-10%) (Smith y Harris 1999). Las pectinas se sintetizan en el aparato de Golgi y, posteriormente, se transportan a la pared celular (Grsic-Rausch y Rausch 2004). Las pectinas de la pared celular aparecen en formas metil-esterificadas. Dichas pectinas pueden modificarse por la acción de las pectinasas, como las pectin metilesterasas (PME), que catalizan la desmetil-esterificación de los homogalacturonanos liberando pectinas ácidas y metanol.

2.2.4.1. Las enzimas pectin metilesterasas (PME)

La PME es una enzima con alta especificidad de sustrato. Actúa sobre las sustancias pécticas que forman parte del material de la pared celular. La enzima desmetila los grupos carboximetil $-\text{COOCH}_3$ de las cadenas pécticas, produciendo ácido poligalacturónico y descendiendo el pH (Balestrieri y col. 1990) ya que aumenta el número de grupos carboxilo $-\text{COOH}$ libres en sus posiciones originales. Esto da lugar a una disminución de la solubilidad de la pectina, siendo este efecto más pronunciado en presencia de sales divalentes (Van Buren 1973). Las enzimas de PME pertenecen a una gran familia multigénica y sus estructuras primaria y cuaternaria están muy conservadas entre los diferentes taxones de plantas.



En *Arabidopsis thaliana*, se han detectado 67 ORFs que codificarían para secuencias putativas de PME. Por tanto, representan un 6,81% del total de enzimas activas del metabolismo de hidratos de carbono (CAZymes) y expansinas en esta especie (Coutinho y col. 2003). Las cifras correspondientes para *Populus trichocarpa* son 89 ORFs y un 5,46%, respectivamente (Geisler-Lee y col. 2006), mientras que en arroz (*Oryza sativa*) se han detectado menos ORFs (35) con secuencias putativas de PME y representan un 3,14% de las CAZymes y expansinas. El menor número de genes de PME en arroz es consistente con el hecho de que las pectinas son menos abundantes en monocotiledóneas que en dicotiledóneas (Smith y Harris 1999).

Debido a que la pared celular constituye una barrera física entre el medio y el contenido interno de las células vegetales, las modificaciones de la pared celular se asocian a menudo con las respuestas de defensa vegetal (Vorwerk y col. 2004).

La actividad de la PME origina un aumento de las cargas negativas en la pared celular (Moustakas y col. 1991), cambia el pH apoplástico y, potencialmente, la actividad de las proteínas apoplásticas. Las cargas negativas generadas por la actividad de la PME permiten la unión de cationes y esta situación puede favorecer o inhibir el crecimiento de las plantas en función de las circunstancias (Pilling y col. 2004). La composición de la pared celular cambia como consecuencia de la exposición al estrés por aluminio, especialmente en las pectinas (Eticha y col. 2005, Hossain y col. 2006, Yang y col. 2008b). Este resultado es significativo ya que la des-esterificación de las pectinas aumenta la densidad de las cargas negativas en la pared celular. Un aumento de la carga neta negativa podría permitir una mayor carga de Al en la pared celular (Cosgrove 2005). Varios trabajos han demostrado la acumulación de Al en la pared celular, por ejemplo, en la pared celular de *Chara corallina* se acumula el 99,9% del Al (Taylor y col. 2000), en la pared celular de las raíces de cebada se ha estimado una acumulación del 85 al 90% del Al (Clarkson 1967), además, las pectinas de la pared celular son el principal sitio de unión del Al (Horst 1995, Chang y col. 1999).

2.2.4.2. Las enzimas de xiloglucano endotransglucosilasa hidrolasas (XTH)

Una de las interacciones claves en la pared primaria de dicotiledóneas tiene lugar entre la celulosa y la hemicelulosa xiloglucano, que en conjunto comprenden las dos terceras partes de la masa de la pared seca (Rose y col 2002). La pared celular a pesar de ser rígida debe ser plástica, por lo que algunas moléculas tienen que regular el control de la fuerza de la pared celular para permitir su extensibilidad. La escisión de cadenas de xiloglucano mediada por enzimas hidrolíticas es una manera de disminuir la rigidez de la pared celular. Dos grupos de investigadores han descrito la existencia de una enzima capaz de realizar cortes y posteriores uniones en la molécula de xiloglucano en tejidos con una elevada tasa de crecimiento. El grupo de Fry y col. (1992) ha denominado xiloglucano endotransglucosilasa (XET) a la enzima que realiza la endotransglucosilación del xiloglucano, mientras que el grupo Nishitani y Tominaga (1992) ha purificado una proteína con una actividad similar que ha denominado endoxiloglucano transferasa o xiloglucano endohidrolasa (XEH).

Posteriormente, se han puesto de manifiesto las funciones de estas dos enzimas. En la actividad endotransglucosilasa de la enzima XET la enzima realiza un corte en la cadena de xiloglucano generando un extremo reductor que se une a otra cadena de xiloglucano u oligosacárido. Por otro lado, la actividad endohidrolítica de la enzima XEH corta la cadena de xiloglucano generando un extremo reductor que se une a una molécula de agua, fragmentando las cadenas de xiloglucano y disminuyendo su longitud (Tabuchi y col. 2001). Se llegó a un consenso entre los investigadores en denominar esta clase de genes que codifican para ambas enzimas (XET y XEH) como xiloglucano endotrasglucosilasa/hidrolasa, *XTH*.

Los análisis filogenéticos de la familia XTH en *Arabidopsis* muestran genes duplicados en distintos cromosomas. Todas las secuencias en conjunto comparten entre un 34 y 90% de aminoácidos similares (Yokoyama y Nishitani 2001, Rose y col. 2002). La mayoría de las proteínas de la familia XTH comparten la secuencia conservada DEIDFEFLG, que se considera constituye el centro catalítico tanto de las actividades hidrolasas como de las transferasas (Okazawa y col. 1993, Campbell y Braam 1998). Otra estructura característica de la familia es la secuencia inicial del primer exón que codifica para un péptido señal responsable de su secreción al apoplasto (Campbell y Braam 1998, Yokoyama y Nishitani 2001).

Actualmente se han identificado más de 33 secuencias génicas en *Arabidopsis thaliana* L. (Yokoyama y Nishitani 2001) que codifican para proteínas pertenecientes a la familia XTH, mientras que en *Solanum lycopersicum* L. se han descrito 12 secuencias completas. En monocotiledóneas, como por ejemplo el arroz, se han encontrado 29 miembros de la familia, demostrando su elevada importancia incluso en las paredes celulares que tienen cantidades bajas de xiloglucano (Uozu y col. 2000). Las XTH están involucradas en diversas funciones, siendo la función más estudiada la pérdida de rigidez de la pared celular, puesto que permite la elongación y crecimiento celular, estudiada en muchas especies vegetales entre la que se encuentran *Arabidopsis* (Antosiewicz y col. 1997, Vissenberg y col. 2000), tabaco (Vissenberg y col. 2000), tomate (Catalá y col. 2000), arroz (Uozu y col. 2000), zanahoria (Hetherington y Fry 1993), guisante (Potter y Fry 1993), maíz (Pritchard y col. 1993). Otra de sus funciones está relacionada con el crecimiento de las raíces laterales (Xu y col. 1995, Antosiewicz y col. 1997, Vissenberg y col. 2000).

Para examinar si la regulación transcripcional está involucrada en la reducción de la actividad de las XET durante el estrés con AI, Yokoyama y Nishitani (2001) analizaron la expresión cuantitativa de 11 de los 33 genes *XTH* presentes en *Arabidopsis*, demostrándose que estos genes tienen una alta expresión relativa en las raíces. Según Yang y col (2011) de todos los genes observados en *Arabidopsis* destacan tres (*AtXTH14*, *AtXTH15* y *AtXTH31*) que tienen una expresión reprimida jugando al parecer un papel clave en la inhibición de la actividad enzimática de XET causada por el AI.



2.2.5. Estrés oxidativo.

En las plantas, el oxígeno es necesario para el crecimiento y desarrollo normal como en todos los organismos aeróbicos, pero exposiciones continuas al oxígeno pueden ocasionar daño celular y finalmente la muerte celular. La molécula de oxígeno da lugar en el interior de la célula a distintas especies reactivas al oxígeno (ROS, reactive oxygen species), especialmente a radicales de superóxido (O_2^-) y de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) que reaccionan con muchos componentes celulares ocasionando un agudo y crónico daño que al final causa la muerte celular (Scandalios 2002). El estrés oxidativo es el resultado de un desequilibrio en la generación y eliminación de ROS dentro de la célula. En las células de las plantas, las especies reactivas de oxígeno se generan en grandes cantidades en las rutas metabólicas, pero en una situación normal, el balance celular redox se mantiene a través de la acción de una gran variedad de mecanismos antioxidantes que están involucrados en la eliminación de ROS.

Para la defensa contra el estrés oxidativo hay enzimas antioxidantes disponibles para eliminar o neutralizar los radicales libres. Entre estas enzimas destacan la peroxidasa, catalasa y superóxido dismutasa (SOD). Los mecanismos de eliminación de ROS involucran a la SOD, cuya síntesis se induce por un incremento de la producción de O_2^- . En este proceso, la SOD convierte O_2^- a peróxido de hidrógeno y luego la peroxidasa y catalasa eliminan el peróxido de hidrógeno formado. El peróxido de hidrógeno y radicales de superóxido pueden ejercer un efecto perjudicial en las células, en la peroxidación lipídica de membranas, y un efecto dañino (mutaciones) en el ADN (Alscher y col. 2002). Las enzimas de SODs se clasifican en tres grupos, dependiendo del metal co-factor que usan: hierro SOD (FeSOD), manganeso SOD (MnSOD) y cobre/zinc SOD (Cu-ZnSOD). Las SOD están localizadas en diferentes compartimientos de la célula, las FeSODs están en el cloroplasto, las MnSODs en la mitocondria y en los peroxisomas, y las Cu-ZnSODs en el cloroplasto, el citosol y posiblemente en el espacio extracelular (Alscher y col. 2002).

Algunos artículos han demostrado en plantas que el estrés por Al puede provocar la producción de ROS, produciendo un daño oxidativo en la membrana plasmática (Yamamoto y col. 2001, Yamamoto y col. 2002) y cambios en la actividad de enzimas antioxidantes (Darkó y col. 2004, Cartes y col. 2012). Otro trabajos han dado a conocer que la actividad de la SOD se incrementa por el tratamiento con Al en arroz, sorgo, *Camelia sinensis* y *Vicia faba* (Meriga y col. 2010, Peixoto y col. 1999, Ghanati y col. 2005, Zhang y col. 2009)



3. El género *Brachypodium*

3.1. Distribución, taxonomía y citología del género *Brachypodium*

Brachypodium distachyon, comúnmente llamado falso bromo púrpura, es nativo de los países de la cuenca del mediterráneo, oriente medio, suroeste de Asia y noreste de África. Ha sido introducido en áreas de Europa central, norte y sur América, Australia, Sudáfrica y Reino Unido (Figura 10) (Schippmann 1991, Garvin y col. 2008).

Se propone la existencia de 15 a 18 especies alrededor del mundo, de las que la mayoría proceden de las zonas meridionales de Europa y Asia estando muy extendidas por la cuenca mediterránea (Catalan y col. 1997, Catalan y Olmstead 2000). Las distintas especies de *Brachypodium* muestran diferentes localizaciones geográficas. *B. pinnatun* ($2n=2x=18$; $2n=4x=28$), *B. sylvaticum* ($2n=2x=14,18$; $2n=4x=28$) y *B. distachyon* ($2n=2x=10$) están ampliamente distribuidas en Europa y Asia. *B. retusum* ($2n=4x=36,38$) cruza el mediterráneo, mientras que *B. rupestre* ($2n=2x=18$; $2n=4x=28$) predomina en Europa occidental, y *B. phoenicoides* ($2n=4x=28$) en el mediterráneo oeste. Otras especies de *Brachypodium* están restringidas geográficamente a ciertas áreas. *B. arbuscula* ($2n=2x=18$) es endémica de las Islas Canarias, *B. glaucovirens* ($2n=2x=16$) y *B. sanctum* son Griegas, *B. serpentini* ($2n=2x=14$) coloniza Albania, *B. boissieei* ($2n=8x=42,46$) está en el sur de España y *B. Kawakamii* ($2n=2x=14$) en Taiwan, mientras que *B. mexicanum* ($2n=4x=40$ ó $2n=8x=40$) y *B. pringlei* se encuentran en América Central y Sudamérica. *B. longisetum* aparece en Nueva Guinea, *B. flexum* ($2n=2x=18$) en el este y oeste de África tropical y Sudáfrica, y *B. bolusii* en Sudáfrica (Tateoka 1968; Mur y col. 2011; Schippmann, 1991; Catalán y Olmstead, 2000; Robertson 1981; Catalán y col. 2012).

La familia Brachypodieae engloba especies con un número básico de cromosomas diferente ($x=5, 7, 8$ y 9). *Brachypodium distachyon* tiene un número básico de $x=5$ cromosomas y se han descrito diferentes casos de ploidía. Los estudios citológicos de los cromosomas de *B. distachyon* indican que el cromosoma 1 es submetacéntrico y claramente más grande que el resto, y es poco probable confundirlo con el cromosoma 2, el cual es acrocéntrico y considerablemente menor que el Cr1. El cromosoma 3 es metacéntrico y más corto que el cromosoma 2. El cromosoma 4 es muy similar al cromosoma 3, pudiendo ser confundidos. El cromosoma 5 es acrocéntrico y el más pequeño de todos (Jenkins y col. 2003).



Posteriormente, se han realizado estudios más detallados de los cromosomas de *Brachypodium distachyon* desechando la caracterización anterior. En general, los cariotipos son claramente asimétricos, siendo el cromosoma más largo el doble de tamaño que el más pequeño. El cromosoma 1 (Cr1) es metacéntrico y es el más largo ($> 7 \mu\text{m}$) y más fácil de discriminar del resto. Los cromosomas metacéntricos 2 y 3 ($5\text{-}6 \mu\text{m}$) son significativamente menores que el Cr1 siendo muy difícil distinguir uno del otro en las preparaciones de squash. Los otros dos cromosomas 4 y 5 son acrocéntricos y son los más pequeños ($3,5\text{-}4,0 \mu\text{m}$) y de difícil identificación, sin embargo, sólo el brazo corto del Cr5 presenta la región organizadora nucleolar (donde se localizan los “clusters” de genes ribosómicos) (Garvin y col. 2008). En concreto, la mayoría de los cromosomas de *Brachypodium distachyon* son identificables en preparaciones de squash, pero para la identificación más precisa de los cromosomas 2 y 3 se requiere utilizar hibridación “in situ” mediante fluorescencia (FISH) con sondas específicas (Garvin y col. 2008).

Wolny y Hasterok (2009) han examinado otras especies del género *Brachypodium* que han proporcionado algunas ideas sobre la organización, la filogenia y evolución de los genomas de *Brachypodium* a nivel cromosómico. Sus estudios han revelado, entre otras cosas, que *B. retusum* ($2n=38$) es probablemente un aloploiploide de *B. distachyon* o un pariente cercano. Del mismo modo, otras dos especies con $2n=28$, *B. pinnatum* y *B. phoenicoides*, son en realidad alotetraploides, ambas con un genoma de *B. distachyon* y otro de *B. pinnatum* ($2n=18$) o *B. sylvaticum* ($2n=18$), respectivamente. Los primeros análisis cariológicos de *B. distachyon* mostraron la existencia de tres citotipos distintos ($2n=10$, 20 y 30) (Robertson, 1981). Por primera vez, Hasterok y col. (2004), mostraron la citotaxonomía de los tres citotipos de *Brachypodium distachyon* basándose en técnicas de Hibridación Genómica “in situ” mediante Fluorescencia (GISH), y mediante Hibridación “in situ” mediante Fluorescencia (FISH) con genes de ADNr (ADNr-FISH) y BAC-FISH. Sus resultados rechazaron el supuesto de evolución por simple duplicación de los tres citotipos ($2n=10$, 20 , 30) indicando que las muestras de $2n=10$ y $2n=20$ correspondían a dos taxones diploides diferentes, con distinto número básico de cromosomas $x=5$ y $x=10$, respectivamente, y que los citotipos con $2n=30$ eran alotetraploides, resultantes de la hibridación y posterior duplicación cromosómica de los citotipos de $2n=10$ y $2n=20$. Idziak y col. (2011) corroboraron los resultados anteriores mediante métodos de pintado cromosómico comparado (CCP). Distribución geográfica de citotipos $2n=10$, 20 , 30 , ver Figura 10.

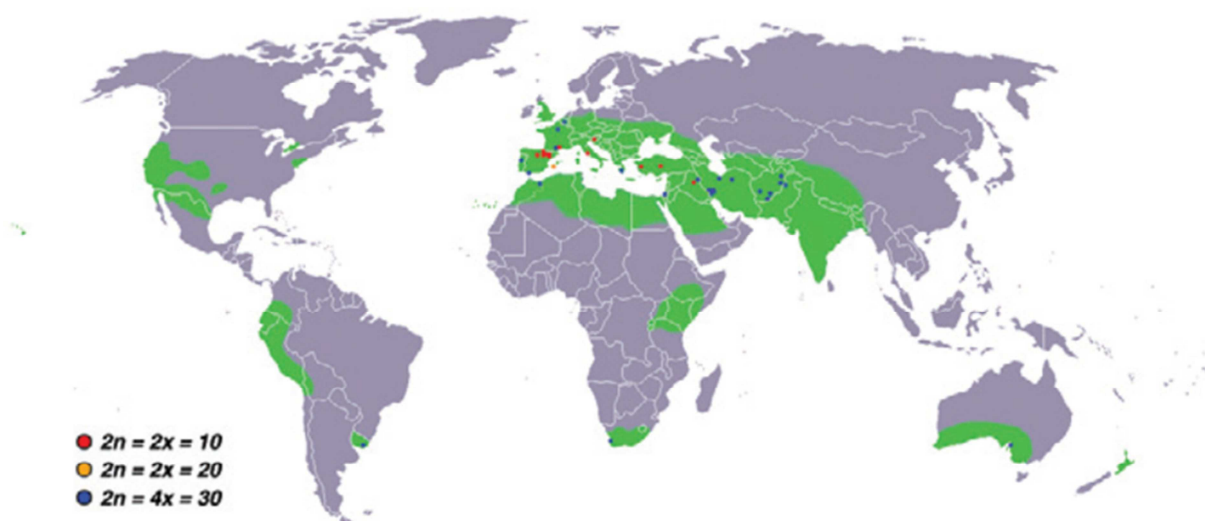


Figura 10. Distribución geográfica de *Brachypodium*. Se observa en verde las áreas de distribución inferidas según registros de herbarios, observaciones de campo y datos de colecciones de germoplasmas. Se señalan los citotipos $2n=2x=10$, $2n=2x=20$ y $2n=4x=30$ caracterizados de acuerdo al contenido de ADN y número cromosómico, en rojo, amarillo y azul, respectivamente. Fuente: Garvin y col. (2008).

Catalán y col. (2012) con el fin de dilucidar si los tres citotipos ($2n=10$, $2n=20$, $2n=30$) representan especies separadas, realizaron estudios morfométricos de 15 caracteres en 36 líneas y poblaciones, análisis citogenéticos, de citometría de flujo, FISH, GISH, secuencias de ADN y CCP, y además estudios filogenéticos con dos genes de plastidios y cinco genes nucleares de diferentes linajes de *Brachypodium*. Los análisis fenotípicos pusieron de manifiesto la existencia de diferencias significativas entre los tres citotipos ($2n=10$, $2n=20$ y $2n=30$), así mismo, las estimaciones del tamaño del genoma confirmaron que los citotipos $2n=10$ y $2n=20$ eran dos especies diploides distintas, mientras que el citotipo $2n=30$ era un alotetraploide derivado de los otros dos citotipos. Los análisis filogenéticos demostraron que los citotipos $2n=20$ y $2n=10$ emergieron de dos linajes independientes y que fueron, respectivamente, el genoma donador materno y paterno del citotipo con $2n=30$. Por lo tanto, aparte de la especie *Brachypodium distachyon* con citotipo $2n=10$, Catalán y col. (2012) describieron otras dos especies nuevas, *Brachypodium stacei* y *Brachypodium hybridum* para los citotipos $2n=20$ y $2n=30$, respectivamente (Figura 11). Esta evolución del género *Brachypodium* ofrece la oportunidad de estudiar los factores involucrados en la poliploidización del genoma. Por eso, el género *Brachypodium* representa un sistema ideal para estudiar el valor de los híbridos sintéticos que aprovechan las interacciones genómicas para ofrecer características beneficiosas no necesariamente presentes en el diploide parental o líneas diploides similares (Mur y col. 2011).

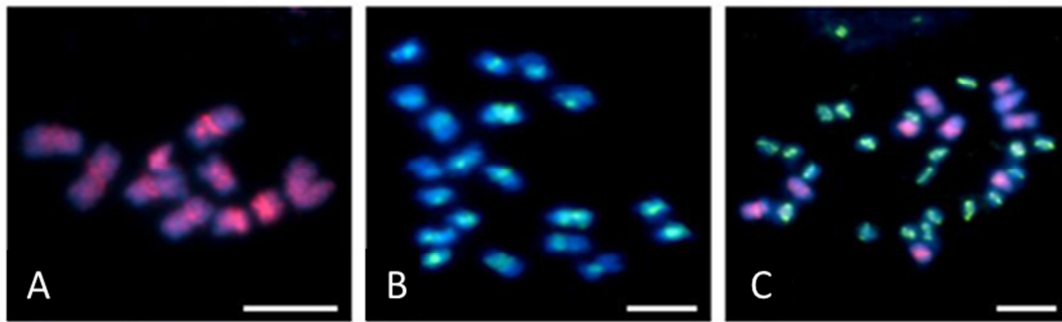


Figura 11. Hibridación genómica “*in situ*” mediante fluorescencia (GISH). Se distinguen los cromosomas de los genomas de *B. distachyon* (A) y *B. stacei* (B), en las dos especies parentales diploides y en el alotetraploide procedente de la hibridación y posterior duplicación cromosómica, *B. hybridum* (C). Escala de la barra 5 μm . Fuente: Catalán y col. (2012).

3.2. *Brachypodium* una planta modelo

Los organismos modelos permiten a los científicos investigar procesos complejos que son difíciles de estudiar en organismos no modelos. Según Flavell (2009), los atributos de una planta modelo son: ser diploide, con pocos cromosomas, genoma pequeño y posibilidad de ser manipulado por vía de transformación. La planta modelo más estudiada en los últimos 30 años ha sido *Arabidopsis thaliana* (L.) Heyhn, considerada ampliamente como un modelo preeminente, su éxito se debe también a una gran comunidad científica dedica a su investigación y una multiplicidad de herramientas genómicas que ha proporcionado muchos avances científicos (Flavell 2009). Sin embargo, *Arabidopsis* es una especie dicotiledónea que no comparte ciertas características con las especies monocotiledóneas, no siendo un buen modelo para la investigación en procesos biológicos de cereales (Garvin 2007). Las monocotiledóneas son una fuente de gran cantidad de calorías para el ser humano y se ha incrementado su utilidad en recursos energéticos sustentables como los biocombustibles. Existen dos plantas que tienen ventajas como modelo de gramíneas, estas son arroz (*Oryza sativa*) y maíz (*Zea mays*), estas plantas tienen la ventaja de tener sus genomas secuenciados, una gran comunidad científica dedicada a su investigación y gran cantidad de recursos genéticos. Los problemas asociados con estas especies son que las plantas tienen una gran altura, largos periodos entre generaciones, gran demanda de requerimientos y cuidados e incluso mucha restricción al acceso de germoplasmas debido a patentes comerciales (Brkljacic y col. 2011). Otra desventaja que tiene arroz como planta modelo es que está separado evolutivamente 50 millones de años de cereales como trigo (Gaut 2002). Recientemente, se han obtenido los primeros borradores de las secuencias de trigo y cebada pero aún no están disponibles a toda la comunidad científica (Brenchley y col. 2012, IBSC 2012). Además, estas especies poseen genomas muy grandes con una gran cantidad de secuencias repetidas que dificultan en gran medida los análisis moleculares. Un problema añadido en el caso de trigo es

que se trata de una especie alohexaploide con 6 juegos de cromosomas procedentes de tres especies diploides parentales distintas. Al igual que arroz y maíz, las plantas de trigo y cebada tienen un tamaño considerable, periodos largos de generación y bastantes requerimientos y cuidados.

Varios análisis filogenéticos han demostrado que los genes de *Brachypodium* divergen del tronco ancestral de las Pooideae, los cuales incluyen la mayoría de las gramíneas más importantes de clima templado, ya sean cereales o forrajeras (Shi y col. 1993, Catalán y col. 1995, Catalán y Olmstead 2000). *Brachypodium distachyon* ha sido el primer modelo propuesto para las gramíneas (Draper y col. 2001). Al igual que *Arabidopsis*, *Brachypodium* tiene un tamaño pequeño, ciclo de vida corto, con un mínimo de seis semanas entre generación y generación y, es fácil de cultivar (Garvin y col. 2008, Draper 2001, Mur y col. 2011). Tiene la ventaja de poseer uno de los genomas más pequeños descritos en monocotiledóneas y cereales (1C aproximadamente 0,3 pg, Wolny y Hasterok 2009) con secuencias de una sola copia o de bajo número de copias y baja cantidad de secuencias repetidas (International Brachypodium Initiative (IBI), 2010). Es una especie autógama, lo que asegura la obtención de líneas puras consanguíneas en tan solo dos generaciones (Vogel y col. 2009). Tiene una más estrecha relación filogenética con especies de Triticíneas de gran importancia económica, como trigo y cebada, que el arroz (Draper y col. 2001, Mur y col. 2011). Además, como ya he mencionado, una planta modelo debe tener como requisito una alta tasa de eficiencia de transformación. En el año 2001 se dieron los primeros pasos para transformar *Brachypodium* a base de bombardeo biolístico (Draper y col. 2001). Luego, Vogel y Hill (2008) maximizaron la eficiencia de transformación de *Brachypodium* en más de un 41%, obteniendo plantas transgénicas a partir de la línea Bd21-3 y empleando *Agrobacterium*. *Brachypodium* además tiene una vasta colección de germoplasmas, marcadores genéticos, un mapa de ligamiento genético, librerías de cromosomas artificiales de bacterias (BAC), mapas físicos, colecciones de mutantes, “microarrays” y varias bases de datos que están facilitando el uso de *Brachypodium* como especie modelo por la comunidad científica (IBI 2010).

3.2.1. Una planta modelo fácil de manejar

Brachypodium al igual que *Arabidopsis*, es particularmente útil para la investigación básica ya que se pueden cultivar gran número de plantas, cuidadosamente controladas, es posible conseguir múltiples generaciones en un año y realizar análisis genéticos (Brkljacic y col. 2011). *Brachypodium* y *Arabidopsis* tienen una altura entre 15 y 20 cm, mientras que cebada, maíz, arroz, sorgo y trigo sobrepasan los 100 cm de altura. La densidad de plantas (bajo condiciones de laboratorio) de *Brachypodium* y *Arabidopsis* es de 1.000 y 2.000 plantas por m², respectivamente, mientras que cebada, maíz, arroz, sorgo y trigo la densidad es de 4 a 120 plantas por m². Los requerimientos nutritivos y de condiciones de manejo y de control son simples en *Brachypodium* y *Arabidopsis*, pero el resto de especies son de requerimientos intermedios (cebada y trigo) a requerimientos muy altos (sorgo, arroz y maíz). El tiempo para conseguir una generación es de 8 a 12 semanas en *Brachypodium* y *Arabidopsis*, mientras que



el resto de especies va entre 10 a 24 semanas (Brkljacic y col. 2011). *Brachypodium* tiene igual ruta fotosintética (C3) que *Arabidopsis*, al igual que arroz, trigo y cebada. Sin embargo, maíz, sorgo y otros cultivos utilizan la ruta fotosintética C4, que es más eficiente en condiciones ambientales cálidas y secas. Por lo tanto, *Brachypodium* no es adecuado para estudios de fotosíntesis C4, no obstante *Brachypodium* está siendo utilizado como un sistema modelo para estudiar la viabilidad de la introducción de un fotosistema C4 en organismos C3 (Brkljacic y col. 2011).

3.2.1.1. Recursos genéticos

Según Garvin y col (2008), hay muchas colecciones disponibles de *Brachypodium*, una está en el banco de germoplasma de USDA, el National Plant Germoplasm System (NPGS), el cual tenía hasta el año 2007 una colección de 30 entradas disponibles, pudiendo haber más hasta la fecha. Otra colección de germoplasma está en el Reino Unido, Aberystwyth, Wales, a estas líneas se las designa con el prefijo “ABR” (Jenkins y col. 2003). La colección de Aberystwyth incluye 38 ecotipos algunos procedentes del NPGS.

Como planta de estudio genético, se necesita un conjunto de recursos genéticos homogéneos y líneas homocigotas, *Brachypodium* es autógama siendo posible observar diversidad genética en las poblaciones (existencia de diferentes genotipos homocigóticos). Por tanto, Garvin (2007) y Vogel y col. (2006) basándose en esta variabilidad, crearon líneas puras consanguíneas de 28 germoplasmas del NPGS, designándolas con el prefijo “Bd” (por ejemplo Bd2-3).

Otro recurso genético importante son las líneas consanguíneas recombinantes (RILs). A partir de cruzamientos entre las líneas parentales diploides Bd2-3, Bd3-1 y Bd21 Garvin (2008) y después de 8 generaciones sucesivas de autofecundación se han obtenidos dos tipos de RIL.

Brachypodium es, además, una planta que se puede encontrar en todos los ambientes climáticos, calurosos, secos, inviernos suaves y húmedos, adicionalmente en climas ecuatoriales como el de Perú que a su vez también tiene regiones a distinta altura. Estos ambientes variados representan una gama de condiciones bióticas y abióticas que indican amplias condiciones de adaptación que se traducen en una variación genética natural dentro de *Brachypodium* que facilita el análisis genómico funcional (Garvin y col. 2008).

3.2.2. *Brachypodium* un representante de las gramíneas

Las gramíneas proporcionan una gran masa calórica para la nutrición humana. Muchas especies de gramíneas perennes son cultivos forrajeros para la alimentación animal, sin embargo, un área muy importante de la investigación se está centrando en identificar otro uso importante de las gramíneas, en este caso como materia prima para la conversión a biocombustibles como etanol (US DOE 2006, Garvin 2007b). La familia de las gramíneas (Poaceae) comprende más de 600 géneros y más de 10.000 especies que dominan muchos sistemas agrícolas y ecológicos. Hasta ahora, los esfuerzos genómicos se han focalizado en dos subfamilias de gramíneas de importancia económica, la Ehrhartoideae (arroz) y el Panicoideae

(maíz, sorgo, caña de azúcar y mijo). La secuencia de los genomas de arroz y sorgo y un mapa físico detallado de maíz ha puesto de manifiesto una amplia conservación de los genes y una poliploidización relativamente reciente (IBI 2010).

La mayor parte de los cereales de estación fresca, forrajeras y pastos pertenecen a la subfamilia Pooideae, la cual es también la más grande de las subfamilias de las gramíneas. Los genomas de muchas pooideas se caracterizan por su gran tamaño y complejidad. Por ejemplo, el trigo hexaploide tiene aproximadamente 17.000 megabases (Mb) distribuidas en tres genomas independientes. Debido a la complejidad del genoma de *Triticum aestivum*, la comparación de los genomas de las tres subfamilias de gramíneas (Ehrhartoideae, Panicoideae y Pooideae) económicamente más importantes (IBI 2010) ha sido muy difícil.

La obtención de la secuencia completa del genoma de *Brachypodium distachyon* se ha convertido en un poderoso recurso de genómica funcional en las gramíneas, constituyendo también un importante avance en la genómica estructural, permitiendo, por primera vez, comparaciones del genoma completo entre miembros de las tres subfamilias de gramíneas económicamente más importantes (IBI 2010).

3.2.2.1. El pequeño tamaño del genoma de *Brachypodium* y su comparación con diversos genomas de Gramíneas

Se ha secuenciado el genoma completo de la línea diploide consanguínea Bd21 siendo el montaje de las secuencias de alta calidad. Sólo el 0,4% de las lecturas no está incluido en el montaje final, obteniéndose una secuencia completa sin precedentes de 272 Mb (US DOE 2006). Comparado con otras gramíneas, el genoma de *Brachypodium* es muy compacto, con retrotransposones concentrados en los centrómeros y regiones en las que cambia la sintenia. Se han detectado un total de 25.532 genes que codifican para proteínas, similar al encontrado en arroz (28.236) y sorgo (27.640) y semejante al de otras gramíneas. *Brachypodium*, arroz y sorgo comparten entre el 77 y 84% de las familias génicas reflejando un origen reciente común (Figura 12). También se ha construido un árbol filogenético con 62 familias de genes de arroz, *Arabidopsis*, sorgo y álamo, observando que en casi todos los casos *Brachypodium* estaba estrechamente relacionado con sorgo y arroz, lo que demuestra que *Brachypodium* es un recurso apropiado para la investigación genómica funcional de gramíneas. Además, un análisis del secretoma ha identificado diferencias sustanciales en la distribución de los genes del metabolismo de la pared celular entre dicotiledóneas y gramíneas, siendo este hallazgo coherente con las diferencias detectadas en sus paredes celulares (IBI 2010).

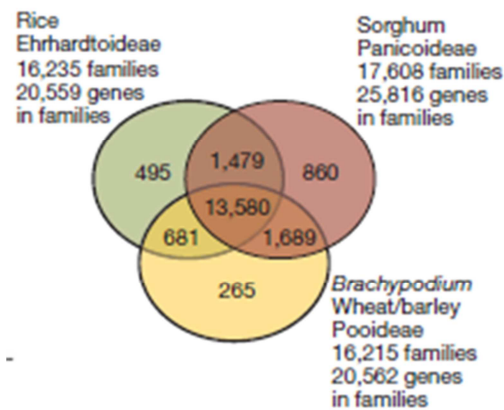


Figura 12. Diagrama de Venn que muestra la distribución de las familias de genes compartidas entre las tres familias representativas de gramíneas Ehrhardtoideae (arroz), Panicoideae (sorgo) y Pooideae (*Brachypodium*, trigo y cebada). Fuente: IBI (2010).

Las primeras evaluaciones de diferentes especies de *Brachypodium* para determinar las características del genoma y establecer su posición evolutiva con respecto a otras especies se han realizado mediante RFLPs y RAPDs. Los resultados mostrados por Catalán y col. (1995) han demostrado que *Brachypodium* es una planta con un genoma pequeño y con baja cantidad de secuencias repetidas. Una secuencia de 371 kb de *B. sylvaticum* se ha comparado con regiones ortólogas de arroz y trigo obteniéndose una perfecta colinealidad de los marcadores genéticos entre *Brachypodium* y trigo, mientras que con arroz se observaron muchas inversiones. Además, concluyeron que *Brachypodium* y las especies de Triticeae habían divergido con de arroz hace 50 millones de años, y *Brachypodium* lo había hecho entre 34 y 40 millones de años con respecto a las Triticeae, por lo tanto, *Brachypodium* está más cerca de las Triticeae que al arroz (Bossolini y col. 2007). Más tarde se hicieron estudios de relaciones evolutivas con genes ortólogos de *Brachypodium* sorgo, arroz y trigo, y se estimaron de nuevo los tiempos de divergencia, así *Brachypodium* y trigo se separaron hace 32-39 millones de años, *Brachypodium* arroz hace 40-53 millones de años, y *Brachypodium* sorgo hace 45-60 millones de años (Figura 13a) (IBI 2010). Los estudios de localización de genes parálogos en *Brachypodium* han puesto de manifiesto la existencia de seis grandes duplicaciones inter-cromosómicas que han tenido lugar durante la evolución de esta especie, con una cobertura del 92,1% del genoma (Figura 13b) (IBI 2010).

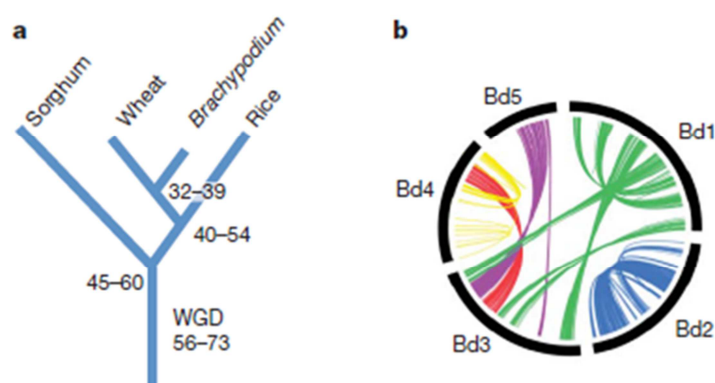


Figura 13. Tiempos de divergencia estimados en base a sustituciones sinónimas (K_s) entre pares de genes ortólogos de *Brachypodium*, arroz, sorgo y trigo. Los tiempos de divergencia están medidos en millones de años (a). Duplicaciones inter-cromosómicas en *Brachypodium* (WGD), diagrama con las seis mayores duplicaciones inter-cromosómicas en *Brachypodium* (b). Fuente: IBI (2010)

Una búsqueda exhaustiva de elementos transponibles en *Brachypodium* detectó un 21,4% de secuencias de retrotransposones en su genoma, mientras que en arroz hay un 26%, en sorgo un 54%, y más de un 80% en trigo (IBI 2010). Comparando secuencias de los genomas de arroz, sorgo, *Aegilops tauschii* (donador del genomio D del trigo hexaploide) y *Brachypodium*, mapas genéticos de cebada y ESTs-de trigo (Figura 14) se han identificado 21.045 genes ortólogos entre *Brachypodium*, arroz, sorgo y Triticineas. Cabe destacar que la reducción en el número básico de cromosomas en *Brachypodium* y trigo se produjo de forma independiente, porque ninguna de las fusiones cromosómicas son compartidas por *Brachypodium* y las Triticeas (IBI 2010).

Un dato importante que resalta el IBI (2010) es que el brazo corto del cromosoma 5 (Bd5S) tiene la mitad de densidad de genes que el resto del genoma, alta densidad de retrotransposones LTRs, elementos *Gypsy* intactos y la más baja densidad de LTR en solitario. Por lo tanto, a diferencia del resto del genoma de *Brachypodium*, el brazo Bd5S está ganando retrotransposones por la replicación y perdiendo menos por recombinación. Se ha propuesto que el cromosoma ancestral de Bd5S alcanzó un punto de inflexión en el que la alta densidad de retrotransposones produjo efectos nocivos en los genes.

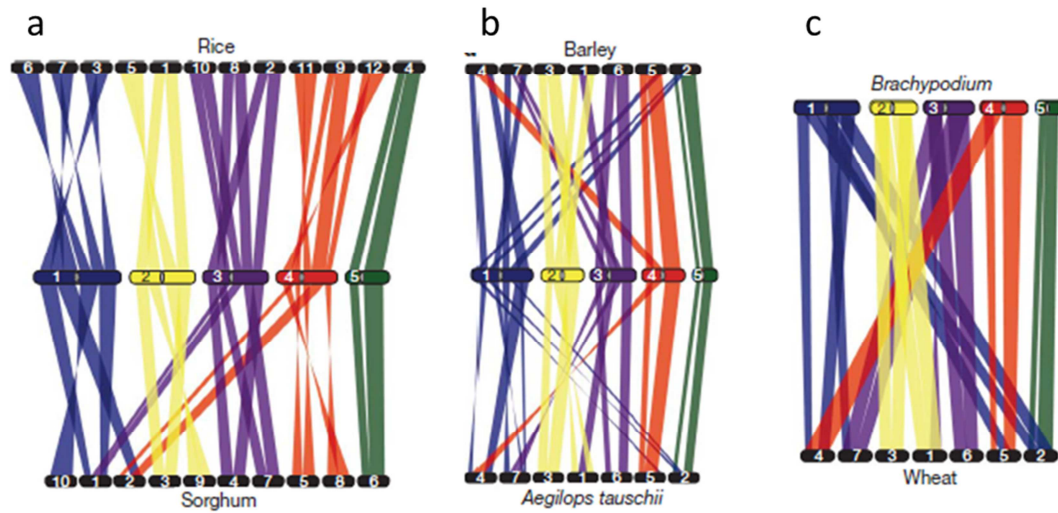


Figura 14. Relaciones de sintenia entre los cromosomas de arroz, *Brachypodium* y sorgo (izquierda). Relaciones de sintenia entre cebada, *Brachypodium* y *Aegilops tauschii* (centro) y entre *Brachypodium distachyon* y trigo (derecha). Fuente: IBI (2010).

3.2.3. Amplia colección de T-ADN y mutagenesis usando TILLING

La alta eficiencia de transformación de *Brachypodium* ha hecho posible la obtención de colecciones de secuencias indexadas de mutantes de T-DNA, al igual que *Arabidopsis* tiene sus líneas mutantes SALK. Un grupo de investigadores ha iniciado un proyecto para crear en *Brachypodium* mutantes con T-DNA, existiendo actualmente alrededor de 4.500 líneas de inserción T-DNA. Otro grupo del USDA-ARS Western Regional Research Center ya ha generado más de 10.000 líneas T-DNA y esperan llegar a las 40.000 (Brkljacic y col. 2011) y alrededor de 6.000 inserciones en secuencias flanqueantes (FSTs) (Mur y col. 2011).

Además, en *Brachypodium* se ha optimizado un método mediante TILLING (Targeted Induced Local Lesions in Genomes) para mutagenizar semillas con agentes químicos como metanosulfonato de etilo (EMS) o azida sódica, para generar mutantes insercionales que son muy útiles para seleccionar individuos que poseen un fenotipo de interés (Mur y col. 2011). Estos mutantes pueden también ser útiles para identificar mutaciones en genes concretos para estudios de genética inversa (McCallum y col. 2000). Se han desarrollado dos poblaciones de TILLING en *Brachypodium*, una en un proyecto del INRA en Francia que posee una colección de 5.530 familias tratadas con azida sódica, denominada plataforma “BRACHYTIL”, y está relacionada con el aislamiento de mutantes para genes que pertenecen a familias multigénicas de la vía de biosíntesis de lignina (Dalmais y col. 2013). Una segunda población de mutantes se ha conseguido en el Instituto Boyce Thompson y tiene 3.000 familias derivadas de semillas tratadas con EMS. En la actualidad las dos colecciones de TILLING están completamente fenotipadas (Brkljacic y col. 2011).

3.2.4. Herramientas bioinformáticas en *Brachypodium*

En 2005 se desarrolló el primer recurso bioinformático significativo de la especie modelo *Brachypodium* depositado en GenBank (Vogel y col. 2006) y consistente en 20.440 ESTs procedentes de unos 6.000 genes. Los ESTs se obtuvieron a partir de cinco librerías de ADNc construidas a partir de ARNs de diferentes tejidos (hoja, callos y raíz entre otros), todos provenientes de la línea consanguínea Bd21. Estas secuencias se usaron para identificar microsatélites (SSR) y para generar marcadores SSLP (polimorfismos de longitud de secuencias simples). Más tarde el DOE-JGI generó la mayor base de datos bioinformática de esta especie modelo con 180.000 ESTs de la línea consanguínea Bd21 (Garvin y col. 2008). Desde el sitio web de *Brachypodium* (<http://www.brachypodium.org>) se puede acceder a un explorador del genoma de *Brachypodium* (<http://www.brachybase.org>) que tiene una alta calidad de cobertura de ensamblaje (8X), pudiéndose descargar la totalidad de ESTs. En esta misma dirección de internet se puede utilizar la herramienta BLAST (<http://www.brachybase.org/blast/>) de búsqueda y alineamiento que permite comparar secuencias de nucleótidos y aminoácidos. También en Gramene (http://www.gramene.org/Brachypodium_distachyon/) y en otras bases de datos (<http://mips.helmholtz-muenchen.de/plant/brachypodium/>) se puede obtener información del genoma completo de *Brachypodium*, de secuencias de proteínas y de sus estructuras, motivos y de regiones promotoras. Modelcrop (<http://www.modelcrop.org/>) también tiene muchas de las funciones de estas bases de datos y también permite comparar el mapa físico de *Brachypodium* con los genomas de arroz y sorgo. En Phytozome (<http://www.phytozome.net>) es posible buscar ortólogos de genes y secuencias con una elevada similitud entre casi todos los genomas de plantas secuenciados hasta la fecha (Mur y col. 2011).

El laboratorio Mockler fue pionero en utilizar la información de las secuencias del proyecto genoma de *Brachypodium* para diseñar un “microarray” que fue desarrollado por la empresa Affymetrix. Este “microarray” contiene aproximadamente 2,55 millones de sondas de expresión que abarcan todos los tipos de genes (incluidos exones e intrones) y aproximadamente 3,95 millones de sondas de secuencias intergénicas. Con este “microarray” se han estudiado los cambios expresión génica producidos por algunos tipos de estrés abiótico, diferentes ambientes de luz y cursos de tiempo diurnos y circadianos (Brkljacic y col. 2011).

3.2.5. Otras herramientas genéticas

El éxito de virus del mosaico estriado de la cebada (BSMV) y del silenciamiento génico inducido por virus (VIGS) como herramienta para estudios de genómica funcional en cebada y trigo ha conducido a su adopción e implementación en otras monocotiledóneas como *Brachypodium* (Lee y col. 2012). Dos estudios recientes han mostrado la eficacia de esta metodología (VIGS) en *Brachypodium*. Uno de estos estudios en *Brachypodium* (Demircan y Akkaya 2010) consigue silenciar el gen que codifica para la fitoeno desaturasa (PDS), utilizando un marcador visual en experimentos de VIGS debido al fenotipo blanqueado o moteado blanco que deja en la hoja.



En otro estudio los resultados muestran que BSMV se puede utilizar como un vector para el silenciamiento de genes en hojas de *B. distachyon* y, posiblemente en raíces, abriendo la posibilidad de usar VIGS para estudios de biología de la raíz de cereales y para explotar la riqueza de la información genómica de la planta modelo de los cereales, *B. distachyon* (Pacak y col. 2010).

3.3. La pared celular de *Brachypodium* y bioenergía

Las paredes celulares de las gramíneas difieren bastante de las paredes celulares de dicotiledóneas en cuanto a la presencia de una mayor red de polisacáridos estructurales, estos polisacáridos están unidos entre sí junto a abundantes cantidades de pectinas, proteínas y componentes fenólicos (Vogel y col. 2008). La composición de monosacáridos no celulósicos de *Brachypodium* es semejante a la de gramíneas de importancia agrícola y significativamente diferente a la de *Arabidopsis*, planta modelo de dicotiledóneas (Gomez y col. 2008). Christensen y col. (2010) compararon la pared celular de *Brachypodium*, *H. vulgare* y *T. aestivum* estudiando principalmente las hemicelulosas. La presencia de (1,3; 1,4)- β -D-glucano se ha correlacionado con fases de crecimiento que afectan a la elongación celular. Sin embargo, los perfiles de expresión de los genes implicados en la síntesis (CSLF, CSLH y un posible gen de síntesis CSLJ) de (1,3; 1,4)- β -D-glucano no mostraron una regulación transcripcional que se correspondiera con la abundancia de (1,3; 1,4)- β -D-glucanos. Por otro lado, la transcripción de CSLH fue relativamente abundante en *Brachypodium distachyon* y casi indetectable en las otras especies.

Estudios de proteómica de la pared celular de *Brachypodium distachyon*, en los que se han analizado hojas y tallos durante la fase de crecimiento activo y en etapas de la madurez, han identificado un total 559 proteínas mediante bioinformática, entre las cuales 314 tenían péptido señal, han puesto de manifiesto diferencias entre los distintos órganos analizados y las etapas de desarrollo, encontrándose también diferencias entre los proteomas de la pared celular de *B. distachyon* y la dicotiledónea *Arabidopsis*. Además, el elevado número de proteínas de función desconocida detectadas en el proteoma relacionado con la pared celular de *B. distachyon* abre nuevos campos de investigación para las paredes celulares de monocotiledóneas (Douché y col. 2013).

Los genes candidatos *CESA* de la pared secundaria en *Brachypodium* tienen secuencias de aminoácidos y expresión similares a los genes *CESA4/7/8* caracterizados en *Arabidopsis thaliana*. Handakumbura y col. (2013) han identificado la función de los genes *BdCESA4* y *BdCESA7*, generando mutantes de pérdida de función específica mediante construcciones con microRNA artificiales. Las plantas transgénicas obtenidas mostraron una menor abundancia de los transcritos de los *BdCESA4* y *BdCESA7* que las plantas normales, teniendo afectadas la zona del tallo, el espesor de la pared celular de fibras y xilema, y la cantidad de celulosa cristalina en la pared celular.

Las paredes celulares de las gramíneas son una fuente importante de energía renovable debido a que los azúcares encerrados en los polisacáridos de la pared celular se pueden convertir en combustible líquido (ej. etanol y butanol) (Vogel y col. 2008). Los polisacáridos representan el 75% de las paredes celulares de las plantas y se pueden romper para producir sustratos de azúcar (sacarificación) a partir de los cuales se puede obtener una amplia gama de productos, incluyendo el bioetanol (Douché y col. 2013). En 2008, el mundo produjo aproximadamente 87 gigalitros de biocombustibles líquidos, que es aproximadamente el volumen consumido por Alemania en ese año. Se espera que las tecnologías de conversión sean más eficaces recurriendo sólo a la lignocelulosa y no a las partes más alimenticias de las gramíneas para el consumo humano (Somerville y col. 2010). Ante los beneficios mostrados a la luz del bioetanol, el Departamento de Energía (DOE) y Agricultura (USDA) junto con Joint Genome Institute (<http://www.jgi.doe.gov>) completaron la secuenciación del genoma de *Brachypodium distachyon* para acelerar el desarrollo de gramíneas como cultivo de biomasa.

Brachypodium distachyon debería ser un sistema modelo útil para la manipulación genética de la composición de la pared celular, para determinar el impacto de las características funcionales en la eficiencia de conversión de energía para la producción de bioenergía (Rancour y col. 2012). El aumento de los recursos dirigidos hacia el desarrollo de la biomasa lignocelulósica como fuente de combustible, junto con los recursos genómicos actuales y emergentes para varias especies, promete marcar el comienzo de una edad de oro de la investigación de la pared celular (Vogel y col. 2008).

3.4. *Brachypodium* como modelo de raíz para trigo

Brachypodium también posee ventajas como modelo para sistemas radiculares. *Brachypodium* y trigo tienen anatomías muy similares, distintas de la anatomía de arroz que se ha especializado en superar condiciones anaeróbicas al tener sus raíces sumergidas. Como planta dicotiledónea, *Arabidopsis* tiene un sistema de raíces aún más distinto con un sistema radicular central que se ramifica y con crecimiento secundario, estas características están ausentes en las gramíneas (Chochois y col. 2012). Los sistemas radiculares de *Brachypodium* tienen un alto grado de similitud evolutiva y anatómica con los sistemas radiculares de trigo, especialmente en las etapas adultas. El pequeño tamaño de *Brachypodium distachyon* y la buena coordinación entre el desarrollo de raíz y hoja facilita los estudios de genes que regulan en gran medida la modulación de la absorción del agua durante la floración y el desarrollo del grano, contribuyendo como planta modelo a descubrimientos genéticos funcionales en sistemas radiculares de cereales (Watt y col. 2009, Chochois y col. 2012).

3.5. *Brachypodium*: interacción planta-patógeno

Dado el interés en *Brachypodium* como especie modelo y la importancia del conocimiento de los sistemas de adaptación de los cereales a patógenos del moho y el hongo de la roya, han surgido estudios de respuesta a las interacciones planta-patógeno en *Brachypodium* (Draper y col. 2001). El primer patógeno mejor caracterizado en *Brachypodium* fue *Magnaporthe grisea*.



Algunos análisis metabólicos han sugerido que el procesamiento de fosfolípidos y la acumulación de jasmonato (hormona que ayuda a prevenir los ataques de hongos e insectos) jugarían papeles importantes en la interacción de *Brachypodium* con *Magnaphorte grisea*. Se ha descrito interacción entre el hongo de la roya y *Brachypodium* pero, algunos trabajos demuestran que no hay interacción con otros hongos de importancia económica como *Blumeria* (oidio), *Septoria*, *Fusarium graminearum* y *Rhizoctonia solani* o *Gaeumannomyces sp* (Mur y col. 2011). Drader y Kleinhofs (2010) mediante marcadores genéticos han construido mapas sintéticos en cebada y *Brachypodium* que incluyen los genes de resistencia de la roya. Los genes de resistencia a la roya del tallo Rpg1 y Rpg4 tienen ortólogos muy similares en otras especies, pero con motivos clave Rpg5, que consisten en un -ILRR (repetición rica en leucina) y un dominio de proteína quinasa serina /treonina. En plantas, el principal papel de las proteínas NBS, que poseen sitios de unión de nucleótidos mediante el motivo LRR (repetición rica en leucina), es su implicación en el proceso de reconocimiento del patógeno que lleva a la resistencia a las enfermedades. En una comparación genómica más amplia Li y col. (2010) observaron una considerable variación de NBS-LRR entre especies de maíz, sorgo, *Brachypodium* y arroz, con 129, 245, 239 y 508 copias de genes NBSs, respectivamente. Aunque las comparaciones se realizaron en gramíneas de clima no templado, la pequeña proporción de NBSs (3,83%) conservados sugiere que la pérdida de NBSs puede ser una tendencia general en especies de gramíneas como resultado de las presiones de selección provocadas por el patógeno.

3.6. Tolerancia a estrés abiótico en *Brachypodium*

La fenología, el rendimiento y la calidad de los granos de especies de la familia Pooideae como trigo, cebada, avena y centeno están significativamente influenciadas por las temperaturas, siendo vulnerables a los cambios climáticos (Lobell y col. 2011, Wallwork y col. 1998). Entre otros efectos el estrés térmico, los cambios de temperaturas de 27 a 32°C, pueden reducir la duración del llenado del grano e influir en la antesis. En *Arabidopsis thaliana* los nucleosomas H2A.Z juegan un papel clave en la mediación de los efectos de la temperatura ambiental sobre el transcriptoma, estos nucleosomas se encuentran con frecuencia en las posiciones que rodean el sitio de inicio de transcripción (TSS) restringiendo el acceso de la maquinaria transcripcional al cuerpo del gen. Boden y col (2013) analizaron la respuesta térmica de los nucleosomas H2A.Z en *Brachypodium*, encontrando que son importantes en la coordinación de la sensibilidad de las gramíneas (de clima templado) cuando aumenta la temperatura durante el desarrollo del grano, así mismo al perturbar H2A.Z con ARNi se reduce fuertemente el rendimiento en granos.

Por otra parte, las temperaturas bajas influyen severamente en el desarrollo y crecimiento de las plantas, resultando en una pérdida global de rendimiento y productividad. La aclimatación al frío mejora la tolerancia de las plantas a las bajas temperaturas mediante la inducción de un conjunto de genes, entre ellos los mejor caracterizados son los genes reguladores del frío (*COR*). Se ha demostrado que el factor de transcripción de unión de repeticiones-C (*CBFs*)

reconoce directamente los promotores de los genes *COR*. Los genes *CBF* se inducen bajo condiciones de temperatura baja. En *Brachypodium* se han identificado tres genes *CBF* (*BdCBF1*, *BdCBF2* y *BdCBF3*). Los resultados han demostrado que los genes *BdCBF* contribuyen a la tolerancia como respuesta al frío, sequedad y estrés salino reconociendo dianas en las regiones “downstream” de los genes *DEHYDRIN5.1* (*Dhn5.1*) y *COR*. Las plantas transgénicas de *Brachypodium* que sobre expresan genes *BdCBF* muestran un aumento de la resistencia a la sequedad, estrés salino y bajas temperaturas. Este resultado ha tenido un gran impacto en los estudios de estrés abiótico en especies de monocotiledóneas ya que es aplicable a otras especies de gramíneas con importancia bioenergéticas (Ryu y col. 2014). Por lo tanto, *Brachypodium distachyon* puede servir también como especie modelo para el estudio de mecanismos moleculares específicos involucrados en respuestas a bajas temperaturas en especies de Pooideae (Li y col. 2012).

El estudio de los mecanismos de tolerancia a la salinidad es uno de los más importantes en el campo en la biología de plantas debido a sus importantes repercusiones agronómicas. Kim y col. (2012) han detectado transcritos que responden al estrés salino usando la técnica de ADNC-AFLP en la línea Bd21 de *Brachypodium*. De un total de 87 fragmentos derivados de la transcripción (TDFs) se identificaron 32 asociados a genes de *Brachypodium* relacionados con el estrés salino.

4. Marcadores para estudiar variabilidad genética y relaciones filogenéticas

Los estudios con marcadores moleculares resultan relativamente económicos y, sobre todo, ofrecen resultados rápidos. Dependiendo de la tecnología utilizada, suelen distinguirse dos grandes grupos de marcadores, los basados en el análisis de proteínas (análisis isoenzimáticos) y los basados en el análisis de ADN (Jimenez y Collada 2000).

Una de las herramientas más poderosas para el análisis de la diversidad genética son los marcadores moleculares, basados en polimorfismos de secuencias de ADN. En efecto, las secuencias de ADN permiten estimar la diversidad y, por lo tanto, las técnicas usadas para evaluar los polimorfismos en el ADN se utilizan para cuantificar la diversidad genética. Además, los marcadores moleculares se emplean para tratar de averiguar la historia evolutiva de las poblaciones de la misma especie y de diferentes especies, permitiendo establecer relaciones filogenéticas (Hoshino y col. 2012).

Con la llegada de la tecnología de la PCR (Polymerase Chain Reaction), en los años 80 (Mullis y Faloona 1987, Saiki y col. 1985), se han abierto nuevas perspectivas en el campo de la biología molecular con gran impacto en aplicaciones con propósitos diversos: diagnóstico molecular, cuantificación de la variabilidad genética, establecimiento de relaciones filogenéticas, programas de mejora animal y vegetal, identificación forense, análisis de paternidad, y otros. Los métodos de cuantificación de la variabilidad genética y de análisis de relaciones filogenéticas (basados en datos moleculares) son ampliamente utilizados no sólo en la biología sistemática y comparativa, sino también en ecología, etología, sociobiología y epidemiología.



Actualmente, se dispone de una gran cantidad de marcadores moleculares para llevar a cabo estudios poblacionales y de relaciones filogenéticas. Entre estos están los polimorfismos para longitudes de fragmentos de restricción (RFLPs), marcadores derivados del empleo de la PCR, como los minisatélites, microsatélites (SSRs), los AFLPs, los RAPDs y los inter-microsatélites (ISSRs). Más recientemente, debido al gran auge y abaratamiento de las técnicas de secuenciación masiva, también se están estudiando, cada vez con mayor frecuencia, los polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) y las inserciones-deleciones (INDELs). Sin embargo, los bajos costos de las técnicas basadas en la PCR han hecho que sus métodos sean los más utilizados. (Hoshino y col. 2012)

Algunos autores clasifican los métodos para el análisis de marcadores moleculares mediante PCR en dos categorías: métodos que estudian un solo locus y métodos que analizan simultáneamente múltiples loci (Hampl y col. 2001). Los que amplifican un solo locus, suelen basarse en la obtención posterior de la secuencia de ADN de una región concreta del genoma (Takahata y Nei 1985, Neigel y Avise 1986). Los métodos de PCR múltiple que amplifican simultáneamente varias posiciones o loci suelen utilizarse para analizar microsatélites (SSRs) y minisatélites. La técnica de PCR múltiple es fácil, barata y rápida (Hampl y col. 2001). Pero también existen otras variantes baratas de la PCR que permiten obtener fragmentos de ADN de diferentes posiciones del genoma en una sola reacción, por ejemplo, RAPDs, ISSRs y AFLPs.

Otra clasificación de los marcadores moleculares se establece en base a su tipo de herencia. Hay marcadores de herencia codominante y de herencia dominante. Los mejores son los codominantes ya que permiten distinguir con claridad a los heterocigotos de los homocigotos y, por tanto, permiten estimar de forma más precisa la variabilidad genética, ya que uno de los mejores estimadores de la variabilidad es la heterocigosidad. Sin embargo, en los marcadores dominantes no es posible distinguir a los heterocigotos de un tipo de homocigotos y, por consiguiente, se pierde precisión en las estimas de variabilidad genética. No obstante, esta distinción es menos importante en el caso de especies autóгамas, compuestas fundamentalmente por individuos homocigotos.

4.1. SSRs

Los SSRs son motivos cortos (de 2 a 6 pares de bases habitualmente) repetidos en tándem de longitud variable que están distribuidos uniformemente en el genoma nuclear de las especies eucariotas en regiones codificantes y no codificantes (Jarne y Lagoda 1996, Tautz y Renz 1984) y, que muestran una alta diversidad alélica (Morgante y Olivieri 1993, Thomas y Scott 1993). Los SSRs también aparecen en el ADN mitocondrial (Soranzo y col. 1999) y en el ADN de cloroplastos (Powell y col. 1995). Su elevada tasa de mutación, comparada con la de regiones codificantes sin secuencias repetidas, les convierte en marcadores potencialmente muy variables que suelen poseer un alto contenido informativo (PIC) y heterocigosidad. Son unos buenos marcadores en especies en las que se ha secuenciado el genoma o en las que hay una gran cantidad de regiones secuenciadas, ya que son fáciles de detectar y es posible diseñar con facilidad parejas de “primers” para amplificarlos mediante PCR. Sin embargo, en aquellas

especies en las que no existen apenas regiones secuenciadas, su desarrollo es más laborioso y caro, aunque hoy en día es posible secuenciar genomas a precios bastante razonables. Los microsatélites (SSRs) son muy útiles en estudios genéticos ya que combinan varias ventajas como su codominancia, multialelismo y su alta heterocigosidad, permitiendo una identificación precisa, incluso distinguiendo individuos estrechamente emparentados, mientras que los RAPD, ISSR y AFLP son marcadores dominantes que detectan sólo la presencia o ausencia de un producto de amplificación. La mayoría de los investigadores prefieren usar marcadores codominantes como los SSR antes que marcadores de herencia dominante (Hoshino y col. 2012). Sin embargo, como ya hemos mencionado esta diferencia no es tan importante en el caso de especies autóгамas. Este tipo de marcadores, dada su gran variabilidad, es adecuado para analizar poblaciones de la misma especie o de especies estrechamente relacionadas que han divergido hace poco tiempo en la evolución, como es el caso de las líneas de *Brachypodium distachyon* y *B. hybridum*. Sin embargo, no son adecuados para estudios de poblaciones de especies que se han separado hace mucho tiempo en la evolución, en estos casos es mejor utilizar secuencias mucho más conservadas y menos variables.

Hay diversos estudios que han demostrado la utilidad de los microsatélites para los estudios de diversidad e identificación de variedades o cultivares en cereales (Donini y Bryan 1998, Virk y col. 1998, Manifiesto y col. 2001). En arroz se han desarrollado más de mil marcadores SSR, de los cuales algunos se han transferido, aplicado y probado en otras especies de gramíneas (McCouch y col. 2002). El genoma de *Brachypodium distachyon* muestra un alto nivel de sintenia con los genomas de especies de gramíneas importantes en la alimentación humana como trigo, cebada y centeno. Por lo tanto, los marcadores SSR desarrollados en *Brachypodium* pueden ser transferidos y utilizados más eficientemente a estas especies que los SSR de arroz, ya que *Brachypodium* está más relacionado evolutivamente (cercano) con estas especies (Draper y col. 2001). En *Brachypodium* se han llevado a cabo estudios de diversidad genética y establecimiento de relaciones filogenéticas con distintas muestras procedentes de Turquía empleando SSRs (Vogel y col. 2009) y también se ha obtenido un mapa genético de ligamiento con 139 SSRs usando una F_2 procedente del cruce de las líneas diploides puras Bd3-1 y Bd21 (Garvin y col. 2010).

La frecuencia de aparición de SSRs en dicotiledóneas es considerablemente más alta que la observada en monocotiledóneas. Entre las monocotiledóneas, la frecuencia de los SSRs en arroz es casi el doble de la encontrada en sorgo y *Brachypodium*. Las repeticiones de un nucleótido dominan sobre los otros tipos de SSRs (di- tri- tetra- penta- y hexanucleótidos) en dicotiledóneas y monocotiledóneas (Sonah y col. 2011). En *Brachypodium* la frecuencia de los SSR trinucleótidos es más alta que las de otro tipo de repeticiones, habiendo una mayor cantidad en regiones ESTs (Sonah y col. 2011, Vogel y col. 2009). La proporción de las repeticiones de tetra- penta- y hexanucleótidos varía entre un 2 y un 5% en *Brachypodium*, observándose datos similares en sorgo, arroz y *Arabidopsis* (Sonah y col. 2011, Vogel y col. 2009).



4.2. ISSRs

Los ISSRs (Inter-simple sequence repeats) son productos de PCR obtenidos usando un único cebador compuesto por repeticiones de dinucleótidos, trinucleótidos, tetranucleótidos y pentanucleótidos (Zietkiewicz y col. 1994). Los fragmentos que se amplifican proceden de regiones del genoma situadas entre dos microsatélites sucesivos orientados inversamente. Suelen ser marcadores dialélicos, el polimorfismo que detectan es suele deberse a la presencia o ausencia de producto de amplificación y su herencia es habitualmente dominante. Sin embargo, este tipo de herencia no es un inconveniente en especies autóгамas como *Brachypodium*.

Los ISSRs han sido utilizados para la detección de variabilidad genética en maíz (Kantety y col. 1995, Pejic y col. 1998), *Citrus trifoliata* (Fang y col. 1997), trigo (Nagaoka y col. 1997), patata (Prevost y Wilkinson 1999), *Diplotaxis* (Martín y Sanchez-Yélamo 2000), judía (Métais y col. 2000), centeno (Matos y col. 2001), cebada (Fernández y col. 2002) además de en patógenos como *Macrophomina phaseolina* (Jana y col. 2005). Según Fernández y col. (2002) los resultados de la aplicación de los ISSRs demuestran una elevada conservación de ciertas secuencias repetidas (SSRs) dentro de especies del mismo género, lo que facilita la utilización de los mismos “primers” en especies relacionadas.

En una colección de 39 trigos panaderos de Irán se estimó la diversidad genética con ISSRs encontrando un alto nivel de polimorfismo y siendo muy eficaces para detectar variabilidad genética intra-específica, además de separar los cultivares según su procedencia (Sofalian y col. 2008). Por otro lado, Emel (2010), utilizó ISSRs para estudiar la variabilidad genética de una colección de 11 triticales hexaploides, demostrando la utilidad de este tipo de marcadores para determinar las distancias genéticas y las relaciones filogenéticas entre diferentes genotipos.

Teniendo en cuenta, que los ISSRs suelen ser bastante polimórficos en otras especies de Poáceas, que *Brachypodium* es una especie autógamma, que estos marcadores proceden de diferentes posiciones del genoma y que son muy reproducibles y baratos de obtener, se puede esperar que sean, también, una buena elección para cuantificar la variabilidad genética y establecer relaciones filogenéticas en esta especie.

III. OBJETIVOS



OBJETIVOS

1. Determinar el grado de tolerancia al aluminio en diferentes líneas de *B. distachyon*, *B. stacei* y *B. hybridum*.
2. Evaluar la exudación de málico y cítrico por las raíces en líneas tolerantes y sensibles al estrés por Al de *B. distachyon* y *B. hybridum*.
3. Medir los cambios en la expresión de ARNm de diferentes genes candidatos relacionados con la tolerancia al estrés por aluminio.
4. Estudiar las secuencias codificantes y secuencias promotoras del gen *BdALMT1* en una línea tolerante y otra sensible.
5. Evaluar la diversidad genética mediante SSRs (microsatélites) e ISSRs (inter-microsatélites) y establecer relaciones filogenéticas entre líneas de diferente procedencia de *B. distachyon* y *B. hybridum*.



IV. MATERIAL Y MÉTODOS



1. Material Vegetal

Los materiales empleados en este trabajo fueron 69 muestras diploides de *Brachypodium distachyon* (Bd), 9 muestras diploides de *Brachypodium stacei* (Bs) y 38 muestras tetraploides de *Brachypodium hybridum* (Bh), los cuales se detallan a continuación en la Tabla 2.

Tabla 2: Origen y ploidia de las líneas y ecotipos de *Brachypodium* utilizados en los estudios.

Nombre	Nomenclatura SSR e ISSR	Localidad	Número de cromosomas	Ploidía	Referencia
Bd2-3		Iraq	2n=10	2x	Garvin, David. Lab ¹
Bd3-1	Iraq3	Iraq	2n=10	2x	Garvin, David. Lab
Bd21	Iraq4	Iraq	2n=10	2x	Garvin, David. Lab
ABR12	Iraq1	Iraq	2n=10	2x	Jenkins y col. 2003
ABR13	Iraq2	Iraq	2n=10	2x	Jenkins y col. 2003
Bd21-3	Iraq5	Salakudin, Iraq	2n=10	2x	Vogel y col. 2008
PI254867		Salakudin Iraq (Bd21)	2n=10	2x	Vogel y col. 2006
ABR1	Turquia1	Kaman, Kiresehir, Turquía	2n=10	2x	Jenkins y col. 2003
ABR11	Turquia2	Manisa, Soma, Turquía	2n=10	2x	Jenkins y col. 2003
ABR14	Turquia3	Turquía	2n=10	2x	Jenkins y col. 2003
BdTR2C	Turquia9	Kaşören, Turquía	2n=10	2x	Vogel y col. 2009
BdTR12C	Turquia8	Beyvelioğlu, Turquía	2n=10	2x	Vogel y col. 2009
BdTR13C	Turquia6	Afşar, Turquía	2n=10	2x	Vogel y col. 2009
BdTR11H	Turquia5	Cambazdere, Turquía	2n=10	2x	Vogel y col. 2009
BdTR5I	Turquia4	Yukarı Ç., Turquía	2n=10	2x	Vogel y col. 2009
BdTR9K	Turquia7	Kireçköyü, Turquía	2n=10	2x	Vogel y col. 2009
Adi 10	Turquia10	Adiyaman, Turquía	2n=10	2x	Vogel y col. 2009
GAZ-8		Gaziantep, Turquía	2n=10	2x	Vogel y col. 2009
Bd29-1	Ucrania1	Ucrania	2n=10	2x	Garvin, David. Lab
ABR2	Francia1	Octon, Hérault, Francia	2n=10	2x	Jenkins y col. 2003
ABR8	Italia1	Siena, Italia	2n=10	2x	Jenkins y col. 2003
ABR9	Croacia1	Ljubljana, Croacia	2n=10	2x	Jenkins y col. 2003
E2		Albacete, Guadalajara, España	2n=10	2x	Elena Benavente ²
E4	Albacete1	Albacete, España	2n=10	2x	Elena Benavente
E5		Albacete, España	2n=10	2x	Elena Benavente
E7	Badajoz1	Badajoz, Fregenal, España	2n=10	2x	Elena Benavente
M23	Cádiz1	Cádiz, España	2n=10	2x	Manzaneda y col. 2012
M24	Cádiz2	Cádiz, España	2n=10	2x	Manzaneda y col. 2012
E8		Cuenca, Gabaldón., España	2n=10	2x	Elena Benavente
E10	Cuenca1	Cuenca, Tórdiga, España	2n=10	2x	Elena Benavente
E12		Cuenca, Paso Rocho, España	2n=10	2x	Elena Benavente
E14		Cuenca, H. Marquesado, España	2n=10	2x	Elena Benavente
E16	Cuenca2	Cuenca, España	2n=10	2x	Elena Benavente
E18	Cuenca3	Cuenca, Río cuervo, España	2n=10	2x	Elena Benavente
E20	Granada1	Granada, Onitar, España	2n=10	2x	Elena Benavente
E22		Granada, Zegri, España	2n=10	2x	Elena Benavente
E24		Granada, Iznalloz, España	2n=10	2x	Elena Benavente
E26		Granada, Sierra Baza, España	2n=10	2x	Elena Benavente
M21	Granada2	Granada, España	2n=10	2x	Manzaneda y col. 2012
E28		Guadalajara, España	2n=10	2x	Elena Benavente



(Continuación)

Nombre	Nomenclatura SSR e ISSR	Localidad	Número de cromosomas	Ploidía	Referencia
E31	Guadalajara1	Guadalajara, España	2n=10	2x	Elena Benavente
E32		Guadalajara, España	2n=10	2x	Elena Benavente
E34	Guadalajara2	Guadalajara, España	2n=10	2x	Elena Benavente
E36	Guadalajara3	Guadalajara, España	2n=10	2x	Elena Benavente
E38	Guadalajara4	Guadalajara, España	2n=10	2x	Elena Benavente
ABR3	Huesca4	Huesca, Aisa, España	2n=10	2x	Jenkins y col. 2003
ABR4		Huesca, Arén, España	2n=10	2x	Jenkins y col. 2003
ABR5		Huesca, Jaca, España	2n=10	2x	Jenkins y col. 2003
E41	Huesca1	Huesca, España	2n=10	2x	Elena Benavente
E44		Huesca, España	2n=10	2x	Elena Benavente
E47	Huesca2	Huesca, Escanilla, España	2n=10	2x	Elena Benavente
E50	Huesca3	Huesca, Nuevo, España	2n=10	2x	Elena Benavente
E58	Jaen3	Jaén, El tranco, España	2n=10	2x	Elena Benavente
M30	Jaen4	Jaén, España	2n=10	2x	Manzaneda y col. 2012
E54	Jaen1	Jaén, Paso Tiscar, España	2n=10	2x	Elena Benavente
E57	Jaen2	Jaén, Sierra Segura, España	2n=10	2x	Elena Benavente
M29	Lérida1	Lérida, España	2n=10	2x	Manzaneda y col. 2012
M28		Lugo, España	2n=10	2x	Manzaneda y col. 2012
M32	Murcia1	Murcia, Moratalla, España	2n=10	2x	Manzaneda y col. 2012
ABR6	Navarra2	Navarra, Arcos, España	2n=10	2x	Jenkins y col. 2003
M22	Navarra1	Navarra, Roncal, España	2n=10	2x	Manzaneda y col. 2012
M31	Palencia1	Palencia, España	2n=10	2x	Manzaneda y col. 2012
E60	Segovia1	Segovia, España	2n=10	2x	Elena Benavente
E63	Segovia2	Segovia, Carabias, España	2n=10	2x	Elena Benavente
M26	Valencia1	Valencia, España	2n=10	2x	Manzaneda y col. 2012
M27	Valencia2	Valencia, España	2n=10	2x	Manzaneda y col. 2012
ABR7	Valladolid2	Valladolid, Otero, España	2n=10	2x	Jenkins y col. 2003
M25	Valladolid1	Valladolid, España	2n=10	2x	Manzaneda y col. 2012
E64	Zaragoza1	Zaragoza, Frailes, España	2n=10	2x	Elena Benavente
Oran		Oran, Argelia	2n=20	2x	Unversidad de Orán
E66		Almería, Cala chica, España	2n=20	2x	Elena Benavente
E67		Almería, San José, España	2n=20	2x	Elena Benavente
M17		Almería, Sorbas, España	2n=20	2x	Manzaneda y col. 2012
M18		Almería, Cabo Gata, España	2n=20	2x	Manzaneda y col. 2012
M19		Jaén, Tiscar, España	2n=20	2x	Manzaneda y col. 2012
M20		Jaén, Tiscar, España	2n=20	2x	Manzaneda y col. 2012
E68		Palmas, Lanzarote, España	2n=20	2x	Elena Benavente
E69		Tenerife, Gomera, España	2n=20	2x	Elena Benavente
GRA-788	Iran1	Iran	2n=30	4x	IPK Gatersleben ³
M5	Portugal1	Faro, Portugal	2n=30	4x	Manzaneda y col. 2012
M7	Portugal2	Mogadour, Portugal	2n=30	4x	Manzaneda y col. 2012
M12	Albacete2	Albacete, Nerio, España	2n=30	4x	Manzaneda y col. 2012
E70	Almeria3	Almeria, España	2n=30	4x	Elena Benavente
E71	Almeria1	Almeria, Cala, España	2n=30	4x	Elena Benavente
E72	Almeria2	Almeria, S. José, España	2n=30	4x	Elena Benavente
Hoyo de Pinares (HP)	Avila1	Ávila, España	2n=30	4x	Miguel A Casado ⁴
Cabeza de Buey (CB)	Badajoz3	Badajoz, España	2n=30	4x	Miguel A Casado
Castuera (CA)	Badajoz2	Badajoz, Spain España	2n=30	4x	Miguel A Casado
E73	Badajo4	Badajoz, España	2n=30	4x	Elena Benavente



(Continuación)

Nombre	Nomenclatura SSR e ISSR	Localidad	Número de cromosomas	Ploidía	Referencia
Serradilla (SE)	Caceres2	Cáceres, España	2n=30	4x	Miguel A Casado
M9	Caceres1	Cáceres, Monfrague, España	2n=30	4x	Manzaneda y col. 2012
E74		Cáceres, España	2n=30	4x	Elena Benavente
M6	Cadiz3	Cádiz, Algeciras, España	2n=30	4x	Manzaneda y col. 2012
M3	CiudadReal1	Ciudad Real, España	2n=30	4x	Manzaneda y col. 2012
M2	Cordoba1	Córdoba, España	2n=30	4x	Manzaneda y col. 2012
M8	Gerona1	Gerona, Rosas M., España	2n=30	4x	Manzaneda y col. 2012
M13	Granada3	Granada, Cubillas, España	2n=30	4x	Manzaneda y col. 2012
M16	Granada5	Granada, Baza, España	2n=30	4x	Manzaneda y col. 2012
E75	Granada4	Granada, España	2n=30	4x	Elena Benavente
Aracena (AR)	Huelva3	Huelva, España	2n=30	4x	Miguel A Casado
Cortegana (CO)	Huelva2	Huelva, España	2n=30	4x	Miguel A Casado
M15	Huelva1	Huelva, Lepe, España	2n=30	4x	Manzaneda y col. 2012
E76	Huesca5	Huesca, España	2n=30	4x	Elena Benavente
M1	Jaen6	Jaén, Cazorla, España	2n=30	4x	Manzaneda y col. 2012
M11		Jaén, España	2n=30	4x	Manzaneda y col. 2012
E77	Jaen5	Jaén, España	2n=30	4x	Elena Benavente
E78		Jaén, España	2n=30	4x	Elena Benavente
E82	LasPalmas1	Las Palmas, Betancu., España	2n=30	4x	Elena Benavente
El Molar (EM)	Madrid1	Madrid, España	2n=30	4x	Miguel A Casado
E79		Madrid, Patones, España	2n=30	4x	Elena Benavente
E80		Mallorca, S. Lluís, España	2n=30	4x	Elena Benavente
M14	Murcia2	Murcia, España	2n=30	4x	Manzaneda y col. 2012
M10	Salamanca1	Salamanca, Río Águeda, España	2n=30	4x	Manzaneda y col. 2012
E83	Tenerife1	Tenerife, Buenavista., España	2n=30	4x	Elena Benavente
E84	Tenerife2	Tenerife, Gomera, España	2n=30	4x	Elena Benavente
E81	Zaragoza2	Zaragoza, Puerto Cervera, España	2n=30	4x	Elena Benavente

(1) Garvin, David Laboratorio. USDA-ARS.

(2) Dra. Elena Benavente. Universidad Politécnica de Madrid. Unidad Genética E.T.S.I. Agrónomos. Email: e.benavente@upm.es

(3) IPK Gatersleben, Germany.

(4) Dr. Miguel A Casado. Departamento de Ecología, Universidad Complutense de Madrid, Spain. Email: mcasado@ucm.es



2.- Métodos

2.1 Test de Tolerancia al Aluminio

2.1.1 Cultivo de plántulas en medio de cultivo hidropónico

Para determinar el nivel de tolerancia al aluminio de las diferentes líneas de *Brachypodium* se empleó el test descrito por Gallego y Benito (1997). Cada experimento se realizó por duplicado. Las semillas se esterilizaban durante 10 min en presencia de HgCl_2 (0.1%), se lavaban con agua desionizada y se incubaban durante un día en oscuridad, en placa Petri con papel de filtro humedecido y a 20°C de temperatura. Las semillas germinadas se transferían a un flotador de poliespan con malla de nylon en 2,5 L de la solución nutritiva 0,4 mM CaCl_2 , 0,65 mM KNO_3 , 0,25 mM $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0,01 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y 0,04 mM NH_4NO_3 a pH 4,0 aireada continuamente. Cuatro días después de la siembra, habiéndose cambiado la solución nutritiva diariamente, las plántulas fueron incubadas durante 24 horas en solución nutritiva con aluminio (Al) en forma de $\text{AlKSO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ a la concentración de 10 μM a pH 4,0. Los contenedores con dicha solución se situaban en una cámara de cultivo a 20°C con 16 horas de iluminación al día. Después de la exposición al aluminio las plántulas se emplearon para la medición del recrecimiento de la raíz o los tratamientos de tinciones histoquímicas.

2.1.2 Medición del recrecimiento de la raíz

Después del tratamiento con Al en cultivo hidropónico, 16 plántulas de las líneas diploides *Bd* ABR8, ABR1, ABR9, Bd21, E10 y ABR6, un línea diploide *Bs* E66, y las líneas *Bh* M2, M15, M10, Hoyo de Pinares, Cabeza de Buey (CB), M12, E82, GRA-788, E80 y E78 fueron lavadas con agua desionizada durante 2-3 min, luego teñidas con Eriocromo de Cianina R (0,1%) hasta 3 min, un mayor tiempo de exposición a Eriocromo Cianina R tiene un efecto tóxico en las raíces de *Brachypodium*, más tarde se lavaron con agua del grifo y fueron mantenidas en agua 5 min para quitar el exceso de tinte. A continuación las plántulas se pasaron 48 horas a una solución nutritiva libre de Al, cambiando la solución diariamente. Finalmente se medía el recrecimiento de la raíz desde la zona marcada por el tinte hasta el ápice (meristemo).

2.1.2.1 Tratamiento alternativo de recrecimiento de raíz en cultivo in vitro con Al

Para observar el recrecimiento radicular en líneas *Bd* ABR8 y ABR1 y la línea *Bh* CB se utilizaron tubos de medio de cultivo (15,5 cm de alto y 2,8 cm de diámetro) y medio sólido nutritivo compuesto por: 4,4 gr/L de Murashige & Skoog con vitaminas, 30 g/L Sacarosa y 8 g/L agar (productos de Duchefa) a pH 4,3, los tubos y el medio sólido nutritivo se esterilizaron por separado en autoclave. Se dejaron todos los componentes en una cámara de flujo laminar, cada tubo estaba compuesto por un medio con Al y otro sin Al, primero se adicionó al tubo 40 mL de medio nutritivo con Al a una concentración de 250 ó 500 μM de AlCl_3 (el AlCl_3 fue administrado con un filtro estéril Minisart® Springe Filters, Sartorius Stedim Biotech), se dejó enfriar hasta solidificar completamente, luego se añadieron 15 mL de un medio nutritivo sin Al.



Después de solidificado completamente el medio, se sembraron tres semillas por tubo, las cuales fueron tratadas previamente con lejía al 50% y Tween 20 por 20 min.

2.1.3 Tinciones histoquímicas

Para los tratamientos con tinciones histoquímicas, plántulas de las líneas *Bd* ABR8 y ABR1 y líneas *Bh* GRA-788 y CB fueron cultivadas en medio hidropónico nutritivo como se indicó anteriormente (apartado 2.1.1). Después del tratamiento con Al, las raíces fueron tratadas con diferentes tinciones histoquímicas.

2.1.3.1 Distribución y acumulación del Al

2.1.3.1.1 Tinción con hematoxilina

La tinción con hematoxilina permitió observar la acumulación de Al en las raíces según describe Polle y col. (1978). Las raíces de las plántulas se colocaban en agua destilada durante 30 minutos para eliminar el Al en la superficie de la raíz. Se aplicaba una solución con hematoxilina (0,2% p/v) y KIO_3 (0,02% p/v) durante 15 minutos y luego tres lavados de 15 minutos con agua destilada. Finalmente las raíces se observaron con un estereomicroscopio (SMZ 168, Motic).

2.1.3.1.2 Tinción con Morín

Se cortaba la raíz, aproximadamente 1,5 cm desde el ápice y se incubaba en tampón de acetato de amonio (NH_4OAc) a 5 mM, (pH 5,0) durante 10 minutos (Tice y col. 1992). Luego se teñían con 100 μM Morin (diluido en el mismo tampón NH_4OAc) durante 1h, finalmente se lavaban 10 min con tampón NH_4OAc . Las raíces se observaban con un microscopio Olympus CX31 (longitud de onda de excitación 420 nm y de emisión de 510 nm).

2.1.3.2 Visualización de la peroxidación lipídica:

Con el reactivo de Schiff's se puede visualizar en las raíces peroxidación lipídica a partir de aldehídos, según lo descrito por Yamamoto y col. (2001). Las raíces se cortaban (1,5 cm) y se teñieron con el reactivo de Schiff durante 20 minutos, luego se enjuagaban con preparado fresco de solución de sulfito (0,5% p/v $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_5$ en 0,05 M HCl), pudiéndose mantener estas en la misma solución. Finalmente se realizaba la observación con un estereomicroscopio (SMZ 168, Motic).



2.1.3.3 Determinación de la muerte celular:

Para determinar la muerte celular en las raíces se llevaba a cabo una tinción con azul de Evans (0,025% p/v azul de Evans en 100 μ M CaCl_2 , pH 5,6). Las raíces cortadas (1,5 cm) se tiñeron 10 minutos con azul de Evans, luego fueron lavadas tres veces con 100 μ M CaCl_2 (pH 5,6) (Yamamoto y col. 2001) y posteriormente observadas bajo un estereomicroscopio (SMZ 168, Motic).

2.1.3.4 Distribución de H_2O_2

La distribución de H_2O_2 en las raíces fue detectada con DCF-DA (Jones y col. 2006). Las raíces fueron cortadas (1,5 cm) y colocadas 15 minutos en una solución que contenía 200 μ M CaCl_2 (pH 4,4) y 10 μ M DCF-DA. La fluorescencia del DCF-DA en las raíces fue luego detectada bajo un microscopio Olympus CX31 (longitud de onda de excitación 488 nm y de emisión de 530 nm)

2.1.3.5 Producción de calosa

Se detectó calosa en raíces de acuerdo a lo descrito por Kauss (1992). Las raíces fueron cortadas (1,5 cm) y se tiñeron con unas pocas gotas de azul de anilina al 0,1% (p/v) en tampón 1 M glicerina/NaOH (pH 9,5). Las raíces se observaron directamente con un microscopio de fluorescencia Olympus CX31 (longitud de onda de excitación 395-440 nm y de emisión de 420 nm).

2.1.3.6 Detección de pectinas

Para detectar la existencia de pectinas en el tejido de la raíz se utilizó una modificación del método descrito por Iwai y col. (1999). Las raíces fueron cortadas (1,5 cm) y tratadas 3 min con 0,1 M NaOH para de-metilesterificar las pectinas, se quitó el NaOH y luego se pusieron unas gotas de Rojo de Rutenio diluido con agua destilada 0,02% (p/v) incubando 5 min a temperatura ambiente, después las raíces fueron lavadas con agua destilada hasta aclarar y, posteriormente, observadas bajo un estereomicroscopio (SMZ 168, Motic).

2.2 Cuantificación de ácidos orgánicos

2.2.1 Cultivo de plántulas

Todo el proceso después del paso de la desinfección con lejía fue llevado a cabo en condiciones estériles para prevenir contaminación de los componentes secretados por las plántulas. Para ello todos los utensilios, insumos y soluciones se esterilizaron en autoclave (20 min, 120 $^{\circ}\text{C}$) a excepción de la solución con aluminio que se adicionó por filtración estéril. Se utilizaron semillas de las muestras ABR1, ABR8, GRA-788 y CB. Antes de comenzar el procedimiento, a las semillas se les quitó el lema y las aristas con el fin de disminuir las posibilidades de contaminación durante el crecimiento. En el proceso de desinfección se colocaron treinta semillas de cada línea diploide y tetraploide en tubos “falcon”



desinfectándolas 20 min en 20 mL de 5 g/l NaCl con 0,05% Tween 20 en agitación continua. En una cámara de flujo laminar, las semillas fueron lavadas tres veces con agua estéril y luego fueron colocadas en placas de Petri con papel filtro durante tres días. Se cogieron veinte semillas germinadas y se colocaron en matraces Erlenmeyer de 125 mL con 20 mL de solución nutritiva (misma solución nutritiva utilizada para el cultivo hidropónico) o bien en CaCl_2 a 0,2 mM (pH 4,3). Las semillas sumergidas en la solución y tapadas con papel de aluminio fueron incubadas seis días a 23 °C en un agitador (90 rpm). Después de los seis días se desechó la solución de los matraces y se enjuagaron las plántulas tres veces con 20 mL de 0,2 mM CaCl_2 (pH 4,3). Después se prepararon los tratamientos sin y con aluminio, al primero se añadieron 20 mL de solución CaCl_2 a 0,2 mM (pH 4,3) y al segundo 20 mL de solución CaCl_2 a 0,2 mM con AlCl_3 a 20 μM (pH 4,3), éste último adicionado con un filtro estéril Minisart® Springe Filters (Sartorius Stedim Biotech). De cada tratamiento se cogieron alícuotas de 2 mL para 3 y 24 h que fueron almacenadas a -20 °C para posteriormente cuantificar los ácidos orgánicos por el método enzimático o por cromatografía líquida de alta resolución de fase reversa (RP-HPLC). Al final del muestreo se cortaron las raíces de cada planta y se pesaron agrupando las raíces de cada matraz.

2.2.2 Cuantificación de ácidos orgánicos por el método enzimático

Para la cuantificación de ácido málico, se utilizó el exudado de las raíces obtenido por el procedimiento descrito en el apartado anterior (2.2.1). La cuantificación de ácido málico se realizó según el método descrito por Delhaize (1993) con algunas modificaciones. Para ello se utilizaron mezclas que contenían, en un volumen final de 1475 μL , 625 μL de exudado de raíz, 750 μL de tampón [Glicina 0,5 M (Fluka), Hidrazina hidratada 0,4 M (Sigma-Aldrich), pH 4,9] y 100 μL de NAD 40 mM (Sigma-Aldrich). La mezcla se agitó con vortex por 5 s y se preincubó a 25°C durante 50 min con el objetivo de alcanzar una lectura estable, las cuales fueron medidas con un espectrofotómetro Helios Gamma UV-Vis (Thermo Spectronic) a una absorbancia de 340 nm. Tras la incubación, la mezcla se pasó a una cubeta donde se disparó la reacción al añadir 5 μL de malato deshidrogenasa (Roche) preparado a una concentración de 5 mg/mL incubando la mezcla durante 5 min a 25 °C y midiendo los cambios de absorbancia a 340 nm antes y después de la adición de la enzima. Como blanco se utilizaron mezclas de reacción donde la enzima era sustituido por igual volumen del tampón utilizado en la preincubación. El incremento en la absorbancia a 340 nm, debido a la producción de NADH, es directamente proporcional a la concentración de ácido málico en la muestra. Los valores de incremento de absorbancia a 340 nm se transformaron en μmol de ácido málico, interpolando en una recta construida con concentraciones conocidas de L-(-)-ácido málico 97% (Sigma Aldrich) entre 0,0024 y 0,038 $\mu\text{mol}/\mu\text{L}$ y efectuada de la misma manera a la descrita para las mezclas de reacción. En este caso, el volumen de exudado radicular (625 μL) fue sustituido por una disolución que contiene CaCl_2 a 0,2 mM y AlCl_3 a 20 μM ; pH 4,3.

Semejante a lo descrito en el caso anterior, para la valoración del ácido cítrico, se siguió el protocolo de Zhao y col. (2003), con ligeras modificaciones. Para ello se utilizaron mezclas que



contenían, en un volumen final de 1135 μ l, 1000 μ l de exudado de raíz, 120 μ l Tris-HCl 1M (pH 7,8) y 15 μ l NADH 10mM (Sigma-Aldrich). La mezcla se agitó con vortex por 5 s y se preincubó a 25°C durante 40 min y luego se añadió 2 μ l de la mezcla de enzimas lactato deshidrogenasa (5 mg/mL, Roche) y malato deshidrogenasa (5 mg/mL, Roche) en una proporción 2,5:1 a una temperatura de 25 °C durante 40 min con el objetivo de alcanzar una lectura estable, las cuales fueron medidas con un espectrofotómetro Helios Gamma UV-Vis (Thermo Spectronic) a una absorbancia de 340 nm. Tras la incubación, la mezcla se pasó a una cubeta donde se disparó la reacción al añadir 5 μ l de citrato liasa (Roche) preparado a una concentración de 190 mg/mL incubando la mezcla durante 5 min a 25 °C y midiendo los cambios de absorbancia a 340 nm antes y después de la adición de la enzima. Como blanco se utilizaron mezclas de reacción donde la enzima era sustituido por igual volumen del tampón utilizado en la preincubación. La disminución de la concentración de NADH en la absorbancia a 340 nm es directamente proporcional a la concentración de ácido cítrico en la muestra. La diferencia de absorbancia a 340 nm se transformó en μ mol de ácido cítrico, interpolando en una recta construida con concentraciones conocidas de ácido cítrico monohidratado (Sigma-Aldrich) entre 0,0017 y 0,0265 μ mol/ μ l y efectuada de la misma manera a la descrita para las mezclas de reacción. En este caso, el volumen de exudado radicular (1000 μ l) fue sustituido por una disolución que contiene CaCl₂ a 0,2 mM y AlCl₃ a 20 μ M; pH 4,3.

2.2.3 Cuantificación de ácidos orgánicos por RP-HPLC

2.3.3.1 Preparación de la muestra

Se utilizó 1 mL del exudado de raíz procedente del cultivo de las plántulas, el exudado fue evaporado al vacío en un concentrador SC250 Express speedvac (Thermo Electron Corporation, Asheville, NC, United Kingdom). El residuo seco se resuspendió con 100 μ l de fase móvil (solución acuosa fosfato monopotásico 10mM, pH 2,6).

2.3.3.2 Cuantificación del exudado por RP-HPLC

La cuantificación del exudado de raíz se llevó a cabo mediante RP-HPLC en un cromatógrafo de líquidos Spectro Physics 8810 (Thermo Electrón Corporation, Asheville, NC, USA), equipado con una bomba SP8810, un inyector Rheodine, un detector UV-Visible SP8490 y el programa DateApex Clarity Lite™ para Windows (DateApex Ltda., Praha, Czech Republic) para la obtención e integración de datos. El residuo resuspendido se inyectó en la cabeza de la columna, utilizando las siguientes condiciones de análisis:

- Columna: Fase Reversa (RP). Mediterranea sea C18 de Teknokroma, S.C.L., Spain; dp, 5 μ m, L, 120 mm; d.i., 4,6 mm; presión en columna, 100 bar.
- Fase móvil: solución acuosa de fosfato monopotásico 10mM en agua mili-Q, ajustado con ácido fosfórico 99%; pH 2,6; isocrática a 1 mL/min.
- Volumen de inyección: 10 μ l
- Temperatura: 22°C \pm 0,1°C



- Longitud de onda de análisis: 210 nm
- Rango: 0,0005 unidades

La cuantificación se llevó a cabo mediante la interpolación de la respuesta del detector, en cuentas de área, en la correspondiente recta de calibración. Dicha recta fue construida con L-(-)-ácido málico 97% (Sigma Aldrich), de concentraciones conocidas entre 15 y 112 nmol/mL.

2.3 Técnicas moleculares

2.3.1 Aislamiento, purificación y valoración de DNA

Hojas jóvenes frescas de cada línea o ecotipo de *Brachypodium* fueron colocadas en tubos Eppendorf con bolas de acero inoxidable de 5 mm (Qiagen) y luego machacadas en frío con un homogenizador TissueLyser II (Qiagen). Después de pulverizadas las hojas se utilizaron distintos métodos para extraer ADN genómico, Chemagic DNA Plant Kit (*Chemagen*), DNeasy Plant Mini Kit (*Qiagen*) y el método de CTAB (Doyle y Doyle 1990). Para comprobar la integridad del ADN con un alto peso molecular, las muestras (un total de 200 ng) se pasaron por electroforesis en gel de agarosa 1,2% teñido con bromuro de etidio (BrEt). Posteriormente se valoró su concentración y pureza usando el espectrofotómetro NanoDrop® ND-1000, siendo deseable un valor superior a 1,8 de la relación 260/280 nm y mayor de 1,6 de la relación 260/230 nm ya que son valores indicativos de una mayor pureza y menor contaminación por fenoles y proteínas, respectivamente. Para terminar, el DNA se diluyó a una concentración de 5 ng/μl y se conservó a -20°C.

2.3.2 Aislamiento, purificación y valoración de RNA

Las plántulas de las líneas *Bd* ABR1 y ABR8, además de las líneas y ecotipo *Bh* GRA788 y Cabeza de Buey, crecieron 24 horas en medio nutritivo hidropónico expuestas a 0 y 20 μM AlK(SO₄)₂. Se cortaron hojas y raíces de 30 plántulas por genotipo y se pusieron de inmediato en nitrógeno líquido. Las raíces, por una lado, y las hojas, por otro, fueron homogenizadas en frío con un TissueLyser II (Qiagen), se extrajo el RNA con el método de TRIzol® (Invitrogen) y se purificó con Pure Link™ RNA mini Kit (Ambion) siguiendo las especificaciones de cada fabricante. Para comprobar la integridad del RNA y visualizar las subunidades 28S y 18S, 1 μg total de las muestras se analizaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 1,2% teñidos con bromuro de etidio (BrEt). Se valoró su concentración y pureza usando el espectrofotómetro NanoDrop® ND-1000, siendo deseables unas relaciones de 260/280 nm y de 260/230 nm mayores de 2. El RNA se ajustó a una concentración de 200 ng/μl y se conservó a -20°C para estudios posteriores de expresión génica, mientras que el stock de RNA se conservó a -80°C.



2.3.3 Amplificación de ácidos nucleicos por PCR

La mezcla de reacción se realizó en volúmenes que iban desde los 20 a los 14 μ l, y contenía entre 30-20 ng de ADN molde, 5 pmoles de cada cebador, y 10 a 7 μ l de 2x Master Mix (Qiagen). Las reacciones se llevaron a cabo en dos termocicladores: PTC-100 (MJ Research) y G-Storm I (Gene Technologies Limited). El programa básico de amplificación fue: desnaturalización inicial de 3 min a 95°C, 30-35 ciclos compuestos por: Desnaturalización: 20 s a 95°C, Hibridación: 30 s a 55-65°C, Extensión: 35 s a 72°C, Extensión final de 7 min a 72°C.

Los productos de amplificación obtenidos fueron separados mediante electroforesis en agarosa entre 1,2 y 2% con BrEt. En las electroforesis se empelaron marcadores de peso molecular comerciales de 100bp o de 1Kb (Biotools).

2.3.4 Clonación de secuencias

Los productos de amplificación con el tamaño esperado fueron extraídos de los geles de agarosa (1,2%) y posteriormente purificados con el kit comercial FavorPrep Gel/PCR Purification Mini Kit (FAVORGEN), las secuencias de menor tamaño se enviaban a secuenciar directamente a una concentración de 30 ng/ μ l. Las secuencias de mayor tamaño o provenientes de especies tetraploides, después de la purificación fueron clonadas con el kit pGEM[®]-T Easy Vector System I (PROMEGA), según las especificaciones del fabricante. La selección de colonias transformadas se realizó cultivando las células durante 22 horas a 37 °C en placas petri con LBA (LB más ampicilina 100 mg/mL) con 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactósido (X-GAL, Duchefa, Holanda) e isopropil-tio- β -Dgalactósido (IPTG, Duchefa, Holanda). Las colonias blancas seleccionadas se cultivaron en 2 mL LBA líquido durante 18 horas a 37°C y 200 rpm. El DNA plasmídico se purificó usando High Pure Plasmid Isolation Kit (Roche). Los plásmidos fueron enviados a secuenciar a una concentración de 100 ng/ μ l.

2.3.5 Análisis de secuencias

Las secuencias de *Brachypodium distachyon* ortólogas de genes candidatos de tolerancia al aluminio detectados en otras especies (trigo, cebada, centeno, etc) se buscaron (mediante BLAST) en las siguiente bases de datos: www.brachypodium.org www.plantgdb.org/BdGDB/, www.modelcrop.org, www.phytozome.net. Los nombres de los genes candidatos utilizados y el registro en su base de datos de las especies analizadas se detallan en la Tabla 3.



Tabla 3: Nombre de genes y código de registro en GenBank de genes candidatos a la tolerancia al aluminio descritos en distintas especies.

Especie	Accession	Gen	Familia	Fuente
<i>Triticum aestivum</i>	AB081803.1	<i>TaALMT1</i>	ALMT	Sasaki y col. 2004
<i>Oryza sativa</i>	NM_001063889	Os06g0268800	ALMT	Tanaka y col. 2008
<i>Oryza sativa</i>	NM_001071993	Os10g0572100	ALMT	Tanaka y col. 2008
<i>Secale cereale</i>	EU790564	<i>ScMATE1=ScFRDL1</i>	MATE	Silva-Navas y col. 2012
<i>Hordeum vulgare</i>	AB302223	<i>HvMATE1=AACCT1</i>	MATE	Furukawa y col. 2007
<i>Sorghum bicolor</i>	XM_002465593	<i>SbMATE1</i>	MATE	Paterson y col. 2009
<i>Secale cereale</i>	AB571882	<i>ScFRDL2</i>	MATE	Yokosho y col. 2010
<i>B. distachyon</i>	BRADI3G02170.2	<i>BdMATE</i>	MATE	IBI 2010
<i>Hordeum vulgare</i>	AK250977	<i>HvMDH1</i>	MDH	Sato y col. 2009
<i>Hordeum vulgare</i>	AK252534	<i>HvMDH2</i>	MDH	Sato y col. 2009
<i>Zea mays</i>	NM_001155260	<i>ZmPME</i>	PME	Schnable y col. 2009
<i>Oryza sativa</i>	AB379846	<i>OsART1</i>	“zinc finger” C ₂ H ₂	Yamaji y col. 2009
<i>Oryza sativa</i>	NM_001070051	<i>OstDT</i>	tDT	Tanaka y col. 2008
<i>Hordeum vulgare</i>	AK248736	<i>CS</i>	Citrato Sintasa	Sato y col. 2009
<i>Hordeum vulgare</i>	EU977179	<i>HvME</i>	Enzima málica dependiente de NADP	Liu 2008
<i>Hordeum vulgare</i>	AK251785	<i>HvFH</i>	FH (Fumarasa)	Sato y col. 2009
<i>Hordeum vulgare</i>	AK363344	<i>HvCSOD</i>	SOD	Matsumoto y col. 2011
<i>Triticum aestivum</i>	AK333204	<i>TaMSOD</i>	SOD	Kawaura y col. 2009
<i>Arabidopsis thaliana</i> (At)	AT5G13870	<i>AtXTH-5</i>	<i>xiloglucano endotransglicosilasa / hidrolasa</i> (XTH)	Tabata y col. 2000
<i>A. thaliana</i>	At4g25820	<i>AtXTH-14</i>	XTH	Mayer y col. 1999
<i>A. thaliana</i>	At4g14130	<i>AtXTH-15</i>	XTH	Mayer y col. 1999
<i>A. thaliana</i>	At3g44990	<i>AtXTH-31</i>	XTH	Salanoubat y col. 2000

Las secuencias de las regiones codificantes de los genes de *Brachypodium* fueron analizadas y alineadas con los programas Chromas Pro (Technelysium Pty Ltd) y MEGA versión 5.1 (Kumar y col. 2004). Los programas utilizados para predecir los dominios y la estructura de las hipotéticas proteínas de los genes candidatos se indican en la tabla 4.



Tabla 4: Programas utilizados para deducir las características de las proteínas.

Programa	Dirección web	Referencia
MEMSAT	http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/	Jones 1999
TMAP	http://www.mbb.ki.se/tmap/index.html	Persson y Argos 1997
TopPred2	http://bioweb.pasteur.fr/seganal/interfaces/toppred.html	Claros y Von Heijne 1994
HMMTOP	http://www.enzim.hu/hmmtop/	Tusnády y Simon 1998
PHDhtm	http://www.embl-heidelberg.de/predictprotein/	Rost y col. 2004
DAS	http://www.enzim.hu/DAS/DAS.html	Cserzo y col. 2002
TMHMM	http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/	Krogh y col. 2001

También se usaron diversos programas disponibles en la red (Tabla 5) para detectar diferentes motivos en secuencias promotoras y terminadoras y para la predicción de motivos con potencialmente reguladores de la transcripción-expresión de los genes.

Tabla 5: Programas de búsqueda de motivos reguladores de la transcripción

Programa	Dirección	Referencia
McPromoter MM	http://genes.mit.edu/McPromoter.html	Ohler y col. 1999
Promoter Inspector	http://www.genomatix.de/online_help/help_gems/PromoterInspector_help.html	Kondrakhin y col. 1995
Dragon Promoter Finder	http://research.i2r.astar.edu.sg/promoter/promoter1_5/DPF.htm	Bajic y col. 2002



2.3.7 Análisis de expresión génica

2.3.7.1 Transcripción inversa en ensayos de expresión génica

Los ARN mensajeros de hojas y raíces de plántulas de ABR1, ABR8, GRA-788 y CB sin tratamiento y con tratamiento de aluminio (20 μ M) fueron retrotranscritos para obtener ADNc a partir de 2 μ g ARN total (ver procedimiento “Extracción de ARN”) con el kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit para 200 reacciones (Applied Biosystems™), empleando cebadores aleatorios (con el objeto de obtener ADNc tanto de los ARN mensajeros como de los ARN ribosomales, que servirían posteriormente como genes de referencia en los análisis de cuantificación de la expresión génica) y transcriptasa reversa. La preparación de la reacción fue establecida de acuerdo a las especificaciones del fabricante. El ADNc fue conservado a -20°C.

2.3.7.2 Determinación de la expresión génica mediante PCR semicuantitativa

Los ADNc obtenidos a partir de los ARNs de plantas tratadas, con y sin Al, se amplificaron con cebadores específicos para cada gen. Los cebadores utilizados (Tabla 6) fueron diseñados con el programa Oligo® con los requerimientos mínimos para los estudios de PCR cuantitativa. Se diseñaron cebadores que amplificaran fragmentos con un tamaño no mayor de 250 pb y a una temperatura de anillamiento de 60°C, adicionalmente se procuró diseñarlos entre dos exones diferentes para prevenir la amplificación de ADN genómico. Se empleó el gen *18S* como control endógeno de la expresión, la pareja de primer usada fue el forward 5' TCAACGAGGAATGCCTAGTAAGC 3' y el reverse 5' ACAAAGGGCAGGGACGTAGTC 3' (la misma pareja se utilizó para las PCR cuantitativas). La reacción se llevó a cabo en un volumen final de 20 μ l, con 2 μ l de la retrotranscripción RT, 10 μ l de Taq PCR Master Mix (*Qiagen*), 2 μ l de cada cebador (5 μ M) y 2 μ l de agua libre de nucleasas.

Las muestras fueron amplificadas en una máquina PTC-100 thermocycler (MJ Research Inc) utilizando el siguiente programa: un paso inicial de 3 min a 95 ° C, 33 ciclos de 20 segundos a 95 °C, 30 seg a 60 °C y 35 seg a 72 °C, seguidos por un paso final de extensión de 7 min a 72 °C. Las reacciones fueron almacenadas a 4 °C. Los productos de PCR se sometían a electroforesis en geles de agarosa al 2,6% con TAE (1X) y se visualizaban bajo luz ultravioleta tras su tinción con bromuro de etidio.



Tabla 6: Cebadores específicos de cada gen utilizados para los estudios de expresión.

Transcripto	Nombre	Secuencia (5'→3')	Exón (*)	Amplicón (pb)	Tº
BRADI5G09690.1	<i>BdALMT1-F</i>	ATGGAGGTTGATCACCAGATCAG	1	93	59
	<i>BdALMT1-R</i>	CCCGAGCCCGAGGACCAACGAG	1		
BRADI1G43810.1	<i>BdALMT2-F</i>	CTCGCTCATCTCGTGTCTGTCT	1	160	59,7
	<i>BdALMT2-R</i>	CCCTCCTGCAGTAAGTGTCCCAATC	2		
BRADI3G33980.1	<i>BdALMT3-F</i>	GGGCATACGCATGGAGTATTGGAA	1	188	56,7
	<i>BdALMT3-R</i>	GGTTGCACCTGCAGTAAATTTCGAGC	1-2		
BRADI1G69770.1	<i>BdMATE1-F</i>	TGGATGTGGATTCTGTGCTAGCGA	7-8	211	60,5
	<i>BdMATE1-R</i>	GTTGTTATCATTCTTGGCGAACG	9		
BRADI3G23150.1	<i>BdMATE2-F</i>	TGGCTGCACGACTAGGTTCAACTCCC	8	192	57,1
	<i>BdMATE2-R</i>	CCAAAATAAATCCGAGCTGCAATACG	9-10		
BRADI3G02170.2	<i>BdMATE3-F</i>	GGCGGAGGGGATATGGGCGCAGGTG	1	149	66,3
	<i>BdMATE3-R</i>	CAGGCCTAGGGCGGCGAGCTGGAG	1-2		
BRADI2G56320.1	<i>BdSTOP1-F</i>	GGACAAGCTGTTCTGGGCATGTT	1	230	57,8
	<i>BdSTOP1-R</i>	CGAAGCTCAACGGCGAGAAATA	1		
BRADI1G18340.1	<i>BdCSOD1-F</i>	TGACACCCAGATCCCCCTGACTG	5-6	162	58,4
	<i>BdCSOD1-R</i>	TAGCCCTGGAGCCCCGATGA	8		
BRADI1G18340.3	<i>BdCSOD2-F</i>	GGAGTGGATGATCCCCCTGACTG	4-5	161	58,5
	<i>BdCSOD2-R</i>	AGCCCTGGAGCCCGATGA	7		
BRADI2G30580.1	<i>BdMSOD-F</i>	GGATCTGGATGGGTGTGGCTAGCTTT	3-4	172	56,8
	<i>BdMSOD-R</i>	AGTCTGGCCTGACATTCTTGTACTGC	5-6		
BRADI1G63020.1	<i>BdFUM-F</i>	GCCCCATCCGTGTTCCAGCGACAAG	1-2	150	60,7
	<i>BdFUM-R</i>	TATTACCTTAGCGGCGCACTTTTG	2-3		
BRADI3G06930.1	<i>BdCS-F</i>	GGCAAGGTAAAAAACCCATGGCCTAA	16-17	222	58,5
	<i>BdCS-R</i>	CGCGGCCTTTTTCAGTAGTTCTC	19		
BRADI2G15740.1	<i>BdMDH1-F</i>	CGTTACTGGGGTGAATGTTCTGTT	3-4	219	58
	<i>BdMDH1-R</i>	TCTCCAAAACTGCACCAGCATAGGC	5-6		
BRADI2G45200.1	<i>BdMDH2-F</i>	CGCAGACATCTCCACATCAACTC	1	223	59
	<i>BdMDH2-R</i>	CATGTTGATAAGAGCATTGGGACAGT	2-3		
BRADI4G33550.1	<i>BdTDT-F</i>	CAAGACCATCGGCGTCAA	5	211	60
	<i>BdTDT-R</i>	CACAGAACCTAGCGTCGGCAGT	5-6		
BRADI2G33450.1	<i>BdME-F</i>	GACATCCAGGGTACTGCGTCAGTT	6-7	248	59,5
	<i>BdME-R</i>	TGCTGCAGAGACTCCTTCTCGACTC	8		
BRADI5G12300.1	<i>BdPME-F</i>	CCGCCACCTTCTCCATCGAG	1-2	216	62,2
	<i>BdPME-R</i>	AGTCGATGGTGCCGGAGATGAC	2		
BRADI1G33840.1	<i>BdXTH15-F</i>	ACCTGGAGGGGAAAGGGA	3	134	60,3
	<i>BdXTH15-R</i>	TGCCGAGAAGGGCGCGTG	3		
BRADI1G27867.1	<i>BdXTH31-F</i>	AGATGCGCTTCCACCTCTG	3	188	59,9
	<i>BdXTH31-R</i>	CCAGTCGGAGGCGTCCAG	3		
BRADI4G16990.1	<i>BdXTH5-F</i>	TGTCGTCGCAGAACTCGGA	2	144	58,6
	<i>BdXTH5-R</i>	TGGGGTCGAACCAGAGGTA	2		
BRADI1G33810.1	<i>BdXTH14_F</i>	TGAGCTCTCGCCCTTCAC	1	111	58,8
	<i>BdXTH14_R</i>	TTGCCGCCCTGCGCCATGC	1		

2.3.7.3 PCR cuantitativa en Tiempo Real mediante SYBR Green I

Para caracterizar con mayor exactitud la expresión de los genes candidatos se empleó el método de PCR cuantitativa con SYBR Green. Se preparaban mezclas de reacción en un volumen final de 10 µl que contenían 5 µl de Fast SYBR Green Master Mix (*Applied Biosystems*), 3,0 pmol de cada primer y el producto de la transcripción inversa que contenía 2 µg de ARN. Las amplificaciones se realizaban utilizando un termociclador 7900HT FAST Real-Time PCR (*Applied Biosystems*) bajo las siguientes condiciones: un ciclo de 95 °C durante 10 min, seguido de 40 ciclos que constaban de un paso de 15 seg a 95 °C y otro de 1 min a 60 °C.

Todas las muestras, controles y diluciones se preparaban por duplicado en placas de 384 pocillos ópticos MicroAmp® (*Applied Biosystems*) según lo recomendado por el fabricante. En cada placa siempre se incluían dos bancos de diluciones, uno para el gen diana y otro para el gen 18S ribosomal como referencia, que permitía la cuantificación del transcrito problema en cada caso. En las placas, además se incluían los controles sin retrotranscrito (No Template control, NTC) con el fin de detectar alguna contaminación por presencia de ADN genómico que no hubiera sido degradado durante el proceso de extracción.

2.3.7.4 Análisis de las PCR cuantitativas en Tiempo Real

Los estudios de expresión génica mediante PCR cuantitativa en tiempo real miden los cambios cuantitativos relativos a la expresión de un gen problema comparado con la expresión de un gen control constitutivo. Se comenzó evaluando la eficiencia de amplificación de los cebadores, para ello, a partir del producto de la transcripción inversa, se realizaron curvas de calibración por duplicado y con cuatro diluciones diferentes, para el gen en estudio y para el control endógeno. La eficiencia de amplificación en porcentaje se calcula por interpolación del valor de la pendiente de la recta de regresión de las diluciones, para cada gen, en la siguiente ecuación:

$$E_X = \left(10^{-\frac{1}{m}} - 1\right) \cdot 100$$

Donde: E_X es la eficiencia de la amplificación y m es la pendiente de la recta.



Como control endógeno se seleccionó el gen *18S*, por su expresión génica constitutiva sin mostrar cambios en los tratamientos, el gen *BdGAPDH* se excluyó del estudio por mostrar cambios de expresión en las muestras tratadas. Dado que las eficiencias de amplificación de los genes de interés y del control fueron altas y equiparables, se utilizó el método de cuantificación relativa $2^{-(\Delta\Delta CT)}$ (Livak y Schmittgen 2001), que se resume en las siguientes expresiones algebraicas:

$$\Delta C_{T-Al} = C_{T-Al}(GI) - C_{T-Al}(18S)$$

$$\Delta C_{T+Al} = C_{T+Al}(GI) - C_{T+Al}(18S)$$

$$\text{Inducción por Al} = 2^{-(\Delta C_{T+Al} - \Delta C_{T-Al})}$$

Donde: C_T es el ciclo en el que comienza a observarse fluorescencia (Cycle Threshold) y está directamente relacionado con la cantidad de partida de transcrito. Así, $C_{T+Al}(GI)$ y $C_{T-Al}(GI)$ son los valores de CT para el gen de interés en presencia y ausencia de Al, respectivamente; y $C_{T+Al}(18S)$ y $C_{T-Al}(18S)$ son los valores de C_T para el gen 18S en presencia y ausencia de Al, respectivamente.

2.3.8 Identificación de región codificante y secuencias flanqueantes de distintos genes Bd

2.3.8.1 Caracterización de región codificante, upstream y downstream del gen *BdALMT1*

Para amplificar el ADN genómico del gen *BdALMT1* en ABR1 y ABR8, y *BsALMT1* en E66 se diseñaron tres parejas de cebadores (Tabla 7) a partir de la secuencia codificante del transcrito BRADI5G09690.1 correspondiente a la secuencia Bd21 y para amplificar la región upstream de las mismas muestras diploides, se diseñaron parejas de cebadores con el software Oligo ® teniendo como referencia la región upstream y downstream del mismo transcrito (Tabla 7). La mezcla de reacción y el programa para la PCR se realizó de acuerdo a lo señalado en el apartado de amplificación de ácidos nucleicos.



Tabla 7: Parejas de cebadores específicos diseñados para las regiones codificante, upstream y downstream del gen *BdALMT1* y *BsALMT1*.

Genotipo/Región del gen	Cebadores	Secuencia (5'→3')	Tamaño ⁽¹⁾ (pb)	T (°C)
Bd/codificante	FCO1	ATGGAGGTTGATCACCAGATCAG	736	60
	RCO1	TAGTGGTGCAGAGGCATGTGAA		
Bd/codificante	FCO2	GTGGAGGAGCTCATCCAGCTCG	805	53
	RCO2	CTTGGAGAAAGGTTTTACTCTC		
Bd/codificante	FCO3	GATGGAATCTGAATGCTTTGGAG	820	55
	RCO3	CTCGCAATGTTGATAACAACATC		
Bs/codificante	FCO4	ATGGAGGTTGATCACCAGATATCC	783	60
	RCO1	TAGTGGTGCAGAGGCATGTGAA		
Bs/codificante	FCO2	GTGGAGGAGCTCATCCAGCTCG	820	53
	RCO2	CTTGGAGAAAGGTTTTACTCTC		
Bs/codificante	FCO3	GATGGAATCTGAATGCTTTGGAG	818	55
	RCO3	CTCGCAATGTTGATAACAACATC		
Bs/Upstream	F-855	TGTCGAGCGCGTGGTACGGAAGT	869	56
	R-856(*)	CCCGAGCCCGAGGACCAACGAG		
Bs/Upstream	F6	TGTCGGGGAATAGATCGGAGA	1.187	57
	R-Up899	AGGTTCCGTACTTCCGTACCAC		
Bd/Upstream	F6	TGTCGGGGAATAGATCGGAGA	1.789	56
	R1(*)	CATCTTTGATCTATCTATACGCCGCC		
Bd/Upstream	F6	TGTCGGGGAATAGATCGGAGA	679	56
	R2	ATCATCAAAGATGTGGCCTGACTTAT		
Bd/Upstream	F1	ATCAAATGAAAGCGGTTCCAT	1.046	57
	R4	CGGTGGGGTGACGGCAACGCAGC		
Bd/Upstream	F2	CCACTAAAGATGTACTGCGATAATCA	596	57
	R4	CGGTGGGGTGACGGCAACGCAGC		
Bd/Upstream	F2	CCACTAAAGATGTACTGCGATAATCA	674	57
	R3	AGACGGCGGCGGGGAGCGAC		
Bd/Upstream	F1	ATCAAATGAAAGCGGTTCCAT	1.969	56
	R2	ATCATCAAAGATGTGGCCTGACTTAT		
Bd/Upstream	F2	CCACTAAAGATGTACTGCGATAATCA	1.519	56
	R2	ATCATCAAAGATGTGGCCTGACTTAT		



Continuación Tabla 7

Genotipo/Región del gen	Cebadores	Secuencia (5'→3')	Tamaño ⁽¹⁾ (pb)	T (°C)
Bd/Upstream	F3	GCCCGGATCTGACGCGCCCTAAT	1.058	58
	R2	ATCATCAAAGATGTGGCCTGACTTAT		
Bd/Upstream	F4	CGAGATTCGCTGCGTTGCCGTCACCC	954	57
	R2	ATCATCAAAGATGTGGCCTGACTTAT		
Bd/Upstream	F5	TGTCTCTCTCGGCCCTACC	1.864	56
	R1(*)	CATCTTTGATCTATCTATACGCCGCC		
Bd/downstream	DT-1F(*)	GCAACACTTCTCTCGGACTTGGT	809	55
	DT-1R	CAAGCAAGTTTGGGTAGGCTAGA		

(*) Los cebadores con asteriscos están solapando con la región codificante del gen *BdALMT1*.

2.3.8.1.1 Marcador molecular que diferencia citotipos de *B. distachyon*, *B. stacei* y *B. hybridum*

A partir de la región upstream y la región codificante del gen *BdALMT1* se diseñó una pareja de cebadores capaz de diferenciar tres citotipos distintos, *B. distachyon* (2n=10), *B. stacei* (2n=20) y *B. hybridum* (2n=30). De forma alternativa se diseñó una segunda pareja de cebadores, por lo tanto dos parejas estaban disponibles para el estudio, una primera pareja originaria de los estudios del upstream de *BdALMT1*, el forward F-855 y el reverse R-856 (Tabla 7), o bien podía utilizarse una segunda pareja compuesta por el forward F-850 (5'-CCGAATACACATCGACCTCCTCAT-3') junto al mismo reverse anterior R-856. La reacción se llevó a cabo en un volumen final de 12 µl con 3,6 µl de ADN (5 ng/µl), 6 µl Taq PCR 2x Master Mix de Qiagen y 1,2 µl de cada cebador (5 µM). Las muestras fueron amplificadas en una máquina PTC-100 thermocycler (MJ Research Inc) utilizando el siguiente programa: un paso inicial de 3 min a 95 °C, 26 ciclos de 20 segundos a 95 °C, 30 seg a 55 °C y 1 min a 72 °C, seguidos por un paso final de extensión de 7 min a 72 °C. Las reacciones fueron almacenadas a 4 °C. Los productos de PCR se sometieron a electroforesis en geles de agarosa al 1,2% con TAE (1X) y se visualizaron bajo luz ultravioleta tras su tinción con bromuro de etidio.



2.3.8.2 Caracterización de secuencias flanqueantes de los genes *BdMATE1*, *BdMATE2*, *BdPME*

Para amplificar la región upstream y downstream de las muestras diploides ABR1 y ABR8, se diseñaron parejas de cebadores (Tabla 8) con el software Oligo ® teniendo como referencia la región upstream y downstream de los transcritos *BdMATE1* (BRADI1G69770.1) y *BdMATE2* (BRADI3G23150.1). La mezcla de reacción y el programa para la PCR se realizó de acuerdo a lo señalado en el apartado de amplificación de ácidos nucleicos

Tabla 8: Parejas de cebadores específicos diseñados para las regiones upstream y downstream de los genes *BdMATE1* y *BdMATE2*.

Genotipo/Región del gen	Cebadores ⁽²⁾	Secuencia (5'→3')	Tamaño ⁽¹⁾ (pb)	T (°C)
Bd/upstream MATE1	UT-1F	CAATGGCCCCGTTGTTCCGCTCC	820	64
	UT-1R	GCTCCTCGGCGGCGGCTCC		
Bd/downstream MATE1	DT-1F	CTGCCATACGCTGATACATTGGTT	789	54
	DT-1R	TGGTACGCATGCTGTTTCTACTCC		
Bd/upstream MATE2	UT-1F	GCGTCCACCTACACCCTACAGA	867	56
	UT-1R	CAAAGCTATAGAAAGAGAGCGAG		
Bd/downstream MATE2	DT-1F	TTTCCTTCGCAGCTGAACATGTA	750	54
	DT-1R	GGATGGAGGAAGTACGCAATAG		

2.3.9 Marcadores para el estudio de la variabilidad genética entre líneas sensibles y tolerantes en *Bd* y *Bh*

En los estudios de variabilidad genética mediante SSR e ISSR se utilizaron 52 líneas diploides de *Brachypodium distachyon* y 33 líneas de *Brachypodium hybridum*, además de una línea diploide E66 de *Brachypodium stacei* como material de referencia en los análisis de SSR, detallados en la Tabla 2.



2.3.9.1 Microsatélites (SSR)

Con la secuencia de Bd21 disponible en la base de datos se buscaron todos los microsatélites existentes en cada uno de los cromosomas de *B. distachyon* con el programa Phobos 3.3.1.1 (Mayer 2010), http://www.rub.de/spezzoo/cm/cm_phobos.htm). Se procuró seleccionar SSR distribuidos a lo largo de los diferentes cromosomas. Para diseñar la PCR multiplex seleccionamos las secuencias que flanqueaban cada lado del microsatélite. Con el programa MPprimer (Shen y col. 2010) se comenzó diseñando 12 parejas de cebadores que fueran compatibles, las restricciones impuestas para determinar la PCR multiplex fueron generar un amplicón no superior a 430 pb, temperatura de anillamiento no inferior a 58°C y una separación mínima de 20 pb entre amplicones. Se hicieron dos grupos de multiplex de 12 parejas de cebadores con el objetivo de obtener dos grupos con alrededor de 9 parejas, debido a que era muy probable que algunas de las parejas se descartara por no cumplir las condiciones mínimas como por ejemplo no amplificar o amplificar más de un fragmento, además de otras condicionantes en el momento del análisis de los fragmentos. Para asegurar las condiciones de las dos multiplex diseñadas, se corroboró la probabilidad de formación de dímeros y estructuras secundarias con la aplicación Oligo® y otras aplicaciones de diseño de cebadores.

Posteriormente, se realizó mediante PCR una prueba de cada pareja de cebadores por separado en muestras diploides (*B. distachyon* y *B. stacei*) y tetraploides (*B. hybridum*) para comprobar la amplificación de un solo fragmento con el tamaño esperado. El volumen de reacción para la prueba fue de 14 µl total con 4,2 µl de ADN (5 ng/µl), 7 µl Taq PCR 2x Master Mix de Qiagen (2,5 unidades de Taq Polimerasa, 1x QIAGEN PCR Buffer con 1,5 mM MgCl₂ y 200 µM de cada dNTP), 1,4 µl de cada cebador (5 µM), el programa de PCR fue igual al mencionado en el apartado de expresión génica. Las amplificaciones se observaron en geles de agarosa a 1,2 % teñidas con BrEt. Se comprobó que los cebadores seleccionados se encontraban en la posición y localización en cada cromosoma de Bd21 (Figura 15) con la aplicación web <http://blast.gamene.org/Multi/blastview>. De esta forma se estableció una multiplex N°1 con 9 parejas de cebadores y otra multiplex N°2 con 8 parejas de cebadores (Tabla 9) con un volumen total de 14 µl. Se optimizaron las mezclas de las reacciones de PCR (Tabla 10) y los programas de PCR. Para la multiplex N° 1: 2 min a 95 ° C paso inicial, 35 ciclos de 45 segundos a 95 ° C, 45 seg a 58 ° C y 2 min a 72 ° C, seguido por un paso final de extensión de 6 min a 72 ° C. Para la multiplex N°2: 3 min a 95 ° C paso inicial, 40 ciclos de 45 segundos a 95 ° C, 45 seg a 57 ° C y 3 min a 72 ° C, seguido por un paso final de extensión de 7 min a 72 ° C. Todas las reacciones de PCR se llevaron a cabo con el termociclador PTC-100 thermocycler (MJ Research Inc).

Finalizada la PCR, fue necesario confirmar la presencia de un patrón esperado antes de enviar los fragmentos a analizar, para ello se tomaron 10 µl de producto y se cargaron en un gel de agarosa de 2,6% teñido con BrEt. Una vez visualizado el patrón de amplificación en geles de agarosa, el resto del producto de la PCR se analizó en el equipo de secuenciación. La mezcla de la reacción fue de 0,25 µl de producto de PCR y 13,75 µl de mezcla de agua mili-Q con el marcador GeneScan™ -500 LIZ® dye size Standards (Applied Biosystems), inyectándose posteriormente en el secuenciador ABI 3730 (Applied Biosystems). Para la identificación del tamaño de los fragmentos se utilizó el programa Peak Scanner Software v 1.0 (Applied Biosystems). Dos marcadores SSR no lograron detectarse de forma grupal en las multiplex en muestras tetraploides tolerantes, por lo tanto, estos marcadores fueron separados del resto y se analizaron sólo en las muestras tolerantes, de esta manera se hizo un nuevo grupo multiplex con dos marcadores Bd3GSSR_145 (Grupo N°1) y Bd4GSSR_219 (Grupo N°2). La mezcla de reacción para esta combinación de SSRs fue de 0,25 µl de cada cebador (6 µM), 6 µl Mater Mix (Qiagen), 3,6 µl ADN y 1,4 µl de agua libre de nucleasas. El programa de PCR fue el mismo al de la multiplex N°2.

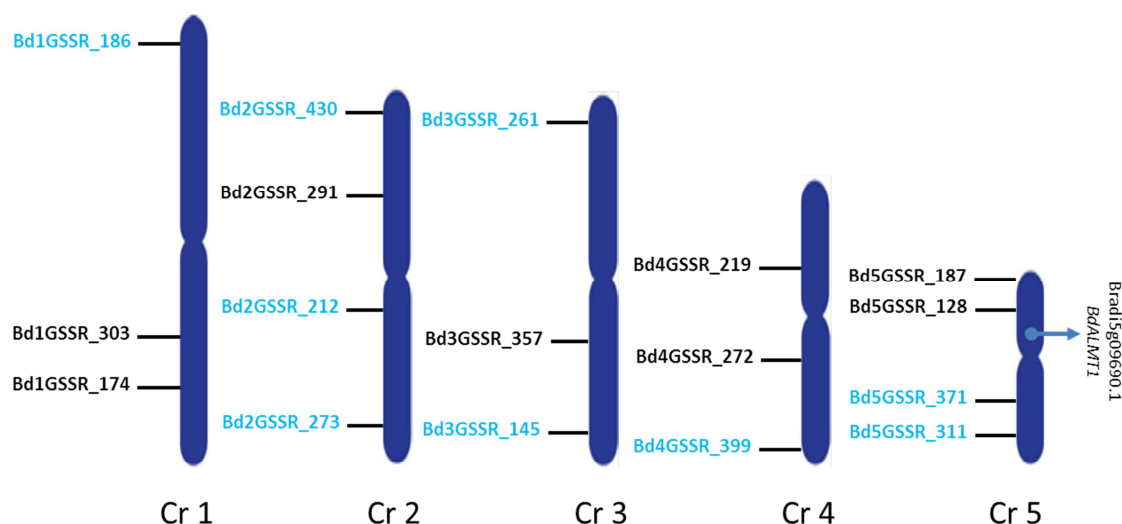


Figura 15: Localización de los marcadores SSR diseñados en cada cromosoma de la secuencia Bd21. Además, localización del gen *BdALMT1* relacionado con la tolerancia al estrés por AI. Los marcadores SSR destacados con color azul pertenecen al grupo multiplex N° 1 y los destacados con color negro pertenecen al grupo multiplex N° 2.



Tabla 9: Marcadores SSR pentanucleótidos usados para el estudio de la variabilidad genética en líneas y ecotipos de *B. distachyon* y *B. hybridum*.

Grupo	Nombre	Cebadores (5'→3')	Unidades tandem	Tamaño esperado ¹ (pb)	Número de repeticiones ¹	Marcador fluorescente	Localización cromosómica ¹
Multiplex Nº 1	1.-Bd3GSSR_145	F-ACGAATGGTTACCGCGTGTGG R-GTGCCGCTCACGTGGAAAAGGA	tcgtt	145	6	TAM	Bd3:58497302
	2.-Bd1GSSR_186	F GGC GAATCTGGGCTCGTTTGCT R TGCGACCCTTTCCCTGGAGTCT	tcttt	186	9	HEX	Bd1:4026171
	3.-Bd2GSSR_212	F-TCTGATGCTGGCAAAGCGCTC R-AACCGCCCTGTCCACATCTCCA	ttttg	212	7	AT565	Bd2:33236583
	4.-Bd3GSSR_261	F-ACGCAGGACGGGAAAGTCGAGA R-AGTCAAAGGCCCGCACAGCTTC	aggat	261	5	FAM	Bd3:3611287
	5.-Bd2GSSR_273	F-TAACTAGGCCACACGCGACGA R-TCGTAAAAGGCGACGACCGCAC	ggcac	273	5	HEX	Bd2:52693639
	6.-Bd5GSSR_311	F-ATATCAGCCGAGGAGCCGACGA R-CGTTTGCCACAGTTGACCCGGA	gtgtg	311	5	FAM	Bd5:26284650
	7.-Bd5GSSR_371	F-TGAAAAGCTCAGCTCGACAGGCA R-AACAGGCCTCTCACACTGCCCA	gtcct	371	5	FAM	Bd5:21214451
	8.-Bd4GSSR_399	F-ACCAGACGCCGAATCCGAAGA R-TACCACCTGTCGTCGTCGTCGT	gggaa	399	4	HEX	Bd4:47450243
	9.-Bd2GSSR_430	F-TACAGCCAGCATTGAAGCGCCC R-CGTCGGAGCCAAAGGAAGCGAT	cacaa	430	4	FAM	Bd2:3429159
Multiplex Nº 2	10.-Bd4GSSR_272	F-ATCGGAGGGCCGGAGCTTGAAT R-TGAGCGCACCAACGCATTAGCA	tttcg	272	5	FAM	Bd4:36931972
	11.-Bd1GSSR_303	F-ACGTGGGATGGTGGAGCGATGA R-CCTCGTCACAGCCCGCATTCAA	catgg	303	5	AT565	Bd1:55905931
	12.-Bd1GSSR_174	F-CAAGCGGGAGCGAAAGGCTTCT R-GTGCTGGTGGGTGGGTTGTTGT	ctctc	174	5	HEX	Bd1:61218832
	13.-Bd2GSSR_291	F-TGCCACCCCGAAGACTCTCGTT R-AAGAGCGACGACCCCGAAAGA	cgacc	291	5	HEX	Bd2:19785476
	14.-Bd5GSSR_187	F-AACATGTCGCTCCCATCGTGC R-ACAGGCAGCAACAGGAACCG	ctctt	187	5	FAM	Bd5:2038354
	15.-Bd4GSSR_219	F-TGTGACGCTGAACTGTACGAGAACAC R-CACAGTGACATCCATAACAAGGA	gaaga	219	5	HEX	Bd4:17520207
	16.-Bd3GSSR_357	F-GCTATGGCGAAACCATGCCCA R-TAGCCCGCACGTTTTTACGCC	tattt	357	7	FAM	Bd3:39626420
	17.-Bd5GSSR_128	F-TCGATCACACCGTCCCATCATCT R-CGTAGGCTCTTTACAGCACACGC	aaaat	128	4	FAM	Bd5:6850036

(1) De acuerdo a la secuencia completa de *Brachypodium distachyon*, Bd21.



Tabla 10: Mezcla de reacción de PCR de dos grupos multiplex SSR.

Grupo PCR Multiplex	Nº 1	Nº 2
ADN (ng/μl)	1,67	1,67
Taq PCR Master Mix, 2x (Qiagen) (μl)	7	7
	Pareja de cebadores (μM)	
	1	0,127
	2	0,127
	3	0,127
	4	0,127
	5	0,127
	6	0,149
	7	0,149
	8	0,149
	9	0,149

2.3.9.2 Intermicrosatélites (ISSR)

Se extrajo el ADN de las muestras de *B. distachyon* y *B. hybridum*, como se indicó en el apartado de extracción de ADN. Los cebadores usados en la PCR provienen de un grupo de cebadores 100/9 de UBC (University of British Columbia), se probaron diez oligonucleótidos en muestras diploides y tetraploides, de ellos un total de siete oligos fueron seleccionados de acuerdo a la consistencia y número de fragmentos amplificados (Tabla 11).

Tabla 11: Secuencias de cebadores ISSR del grupo #9 UBC (University British Columbia). Y = C,T; R= A,G

Pareja primer	Secuencia (5'→3')
ISSR_811	GAGAGAGAGAGAGAGAC
ISSR_834	AGAGAGAGAGAGAGAGYT
ISSR_835	AGAGAGAGAGAGAGAGYC
ISSR_842	GAGAGAGAGAGAGAGAYG
ISSR_844	CTCTCTCTCTCTCTRC
ISSR_846	CACACACACACACART
ISSR_855	ACACACACACACACACYT



Para la preparación de las reacciones de amplificación se utilizó un volumen total de 12 µl de 3,6 µl de ADN (5 ng/µl), 6 µl Taq PCR 2x Master Mix de Qiagen y 2,4 µl de cebador (5 µM), el programa de amplificación fue como paso inicial 5 min a 94 ° C, 45 ciclos de 30 segundos a 94 ° C, 45 seg a 52 ° C y 2 min a 72 ° C, seguido por un paso final de extensión de 6 min a 72 ° C, todo ello con el termociclador PTC-100 thermocycler (MJ Research Inc). Antes de comenzar el estudio de todas las muestras, se hicieron pruebas de los patrones generados por cada ISSR en dos muestras diploides (una sensible y otra tolerante) y dos muestras tetraploides (una sensible y otra tolerante), que fueron analizadas en gel de agarosa 2,6% teñido con BrEt (a 90 V por dos horas). Para visualizar las bandas de todas las muestras diploides y tetraploides se utilizó el instrumento QIAxcel (Qiagen) y el cartucho QIAxcel cartridge (Qiagen), las muestras se pusieron en el instrumento el cual mediante capilaridad separó los fragmentos, los datos se analizaron con el BioCalculator Software (Qiagen). Se hicieron dos réplicas de los productos de la PCR para evaluar la consistencia de los patrones obtenidos.

2.3.9.3 Análisis de las Relaciones Filogenéticas

2.3.9.3.1 Relaciones filogenéticas con SSR

2.3.9.3.1.1 Cálculo de frecuencias alélicas

Se han analizado datos de 52 líneas diploides *Bd* y 33 líneas tetraploides *Bh* en las que se han utilizado 17 parejas de cebadores SSR. Se estudió la frecuencia alélica tomando en cuenta por un lado todas las muestras diploides y por otro todas las tetraploides. La tabla de frecuencias alélicas se obtuvo con el programa CONVERT (Glaubitz 2004).

Los análisis filogenéticos con SSR se llevaron a cabo a partir del método de distancias genéticas, utilizando dos tipos: distancia Standard de Nei (1973) y distancia de cuerda de Cavalli-Sforza (Chakraborty y Jin 1993). Se construyeron dendrogramas empleando dos métodos de agrupamiento: UPGMA y Neigh-bour-Joining (NJ). Para su elaboración se emplearon los programas SEQBOOT, GENDIST, NEIGHBOR y CONSENSUS todos pertenecientes al paquete de programas PHYLIP versión 3.6a2 (Felsenstein 2001). En todos los casos se llevó a cabo un análisis de “bootstrap” con 1000 réplicas, para determinar el grado de soporte estadístico de los agrupamientos. Generalmente, se considera que un grupo está apoyado de forma concluyente cuando el valor de “bootstrap” es 90 o mayor (es decir, cuando el agrupamiento se repite en 90, o más, de cada 100 réplicas). Sin embargo, Hillis y Bull (1993) han demostrado que valores de “bootstrap” mayores de 70 generalmente corresponden a una probabilidad del 95% de que los datos apoyan de forma consistente el agrupamiento. Los dendrogramas fueron hechos usando TREEVIEW versión 1.5 (Page 1996) y el programa FigTree 1.4.0 (Rambaut 2012). Se llevaron a cabo análisis filogenéticos solamente con las muestras diploides (*Bd*), por otro lado solamente con las muestras tetraploides (*Bh*) y con ambos tipos de muestras al mismo tiempo.



2.3.9.3.2 Análisis estadístico de ISSR

Se han analizado los datos de 52 líneas diploides *Bd* y 33 líneas tetraploides *Bh* en las que se han utilizado 7 cebadores ISSR. Para hacer el análisis se observó el patrón de bandas de cada uno de los individuos, determinándose la presencia o ausencia de bandas, tomándose como valor 1 la presencia de una banda y como 0 su ausencia. De esta manera se construyeron dos matrices, una de 139 bandas diferentes obtenidas en las 33 líneas tetraploides (*Bh*) y otra de 116 bandas diferentes obtenidas en las 52 líneas diploides (*Bd*).

2.3.9.3.2.1 Polimorfismos

Se estimó la frecuencia de cada ISSR en las líneas diploides de *Bd* por un lado y en las líneas tetraploides de *Bh* por otro. Con cada cebador de ISSR empleado se obtuvo un patrón de amplificación diferente con un número de productos de amplificación distinto. Para cada cebador de ISSR se estimó el número total de bandas distintas amplificadas, el número de bandas polimórficas, el porcentaje de bandas polimórficas, el número de genotipos diferentes, el número de bandas exclusivas y el poder de resolución ($PR = \sum I_b$, donde $I_b = 1 - [2 \times (0,5 - p)]$, p = proporción de genotipos que contiene la banda; Prevost y Wilkinson 1999). El valor PIC (polymorphic information content) para los SSRs se calculó usando el algoritmo $PIC = 1 - \sum p_i^2$, Smith y col. 1997). El valor PIC para los ISSRs se calculó usando la siguiente fórmula: $PIC = 2 \times p_i \times (1 - p_i)$, donde p_i es la frecuencia de fragmentos amplificados (banda presente) y $1 - p_i$ es la frecuencia de los fragmentos no amplificados (banda ausente) (Roldan-Ruiz y col. 2000).

2.3.9.3.2.2 Índices de similitud

A partir de la matriz de presencia-ausencia de bandas se calculó el índice de similitud entre los distintos individuos con distintos coeficientes, SM (Simple Matching coefficient, Sokal y Michener, 1958); DICE (1945) y Jaccard (1908), utilizando el paquete estadístico NTSYSpc versión 2.01b (Rohlf 1990).

2.3.9.3.2.3 Construcción de dendogramas

Los valores de índices de similitud entre líneas se emplearon para la construcción de un dendrograma, aplicando el método de agrupamiento UPGMA (unweighted pair group method with arithmetic average) (Sneath y Sokal, 1973) con el programa NTSYSpc (Rohlf, 1990) y los valores de "bootstrap" se obtuvieron con el programa Winboot (Yap and Nelson 1996). También se obtuvo una matriz de distancias mediante el programa RESTDIST del paquete informático PHYLIP versión 3.6a2 (Felsenstein, 2001). Para la elaboración del dendrograma se emplearon los programas SEQBOOT, RESTDIST, NEIGHBOR y CONSENSUS. El método del vecino más próximo (NJ) se basa en encontrar pares de OTUs (Operational Taxonomic Units, es decir, unidades taxonómicas operativas que minimicen la longitud total de las ramas del árbol en cada paso del agrupamiento, partiendo de un árbol en forma de estrella. Las estimas de las longitudes de las ramas se obtienen por el método de los mínimos cuadrados. En ambos tipos de árboles (UPGMA y NJ) se llevó a cabo un análisis de *bootstrap* (1000 réplicas) para



comprobar la fiabilidad de los agrupamientos obtenidos. Por último, también se construyeron dendrogramas mediante métodos de Parsimonia empleando el paquete informático BIRCH (Fristensky 2007) y los programas BLMARKER y DOLLOP polymorphism recomendados para marcadores moleculares de herencia dominante como RAPDs, AFLPs e ISSRs. En todos los casos se llevó a cabo un análisis de “bootstrap” con 1000 réplicas, para determinar el grado de soporte estadístico de los agrupamientos.

2.4 Técnicas para la observación de cromosomas por microscopía

2.4.1 Obtención de raíces

Las semillas se pusieron a germinar en placas Petri sobre papel de filtro humedecido manteniéndolas en oscuridad. Cuando las semillas germinaron y las raíces alcanzaron una longitud entre 1 y 2 cm se cortaron y guardaron en tubos Eppendorf con agua destilada fría (5°C). Con objeto de aumentar el número de células en metafase mitótica se colocaron dichos tubos en hielo durante 48 h. A continuación se fijaron las raíces en una solución de etanol (absoluto) y ácido acético en proporción 3:1 (v/v). Las raíces se conservaron a 4°C hasta su análisis.

2.4.2 Preparaciones citológicas en *Brachypodium*

El procedimiento comenzó con una digestión de la pared celular en raíces, el material fijado se depositó en pocillos de plástico en los que se aplicaron tres lavados consecutivos con agua destilada de 5 minutos cada uno, seguidos de otros tres lavados de 5 minutos en tampón citrato (10 mM ácido cítrico-citrato sódico, pH 4,6). A continuación se cubrió el material con un volumen aproximado de 200 µl de una mezcla enzimática compuesta por citohelicasa 0,3% (Sigma), pectoliasa 0,3% (Sigma) y celulasa “Onozuka” RS 0,3% (Sigma) disueltas en tampón de citrato. El material se incubó en esta mezcla a 37°C en cámara húmeda por un tiempo de aproximadamente 1 hora. La reacción enzimática se detuvo sustituyendo la mezcla de enzimas con un doble lavado con tampón citrato durante 5 minutos y dos lavados de 5 minutos con agua destilada. El material ya digerido se utilizó directamente para la realización de preparaciones, manteniéndolas a 4°C en un tiempo no superior a 24 horas.

Tras la digestión de la pared celular se realizaron las preparaciones utilizando el método de “squash” o método de aplastado. Se cortó el ápice de la raíz sobre un portaobjetos, al ápice se le agregó una gota de ácido acético al 45%. En seguida, se dispusieron dos cubreobjetos, uno de ellos al lado de la gota de ácido acético, pero sin entrar en contacto con ella y otro sobre el primero y cubriendo el material. Presionando con papel filtro sobre el cubreobjetos que está situado sobre la muestra se golpeó suavemente sobre el material para provocar su fragmentación y dispersión. La dispersión de las células y el estado en el que se encontraban se verificó en un microscopio de contraste de fases NIKON Labophot-2 (NIKON). Una vez comprobado que las células estaban en el estadio adecuado y suficientemente separadas, se retiró el primer cubreobjetos. La preparación se congeló en nitrógeno líquido para permitir



que las células se fijaran al portaobjetos y así poder retirar el cubreobjetos. Una vez hecho esto fueron sumergidas en etanol al 100% y luego teñidas con una gota de Vectashield (DAPI, Sigma) para su posterior observación en un microscopio de epifluorescencia Olympus BX61 (Olympus Optical Co., GmbH., Alemania) equipado con el programa analySIS pro. Las fotografías se tomaron con una cámara CCD DP7 (Olympus Optical Co., GmbH., Alemania).



V. RESULTADOS

1. Evaluación de la tolerancia al aluminio en especies del género *Brachypodium*.

Hasta la fecha no se han publicado trabajos de tolerancia al estrés por Al en la especie modelo *Brachypodium distachyon* ni en otras especies del género *Brachypodium*. Por ello fue necesario realizar estudios cuantitativos de la respuesta al estrés por Al para estimar la inhibición del crecimiento de la raíz, y cualitativos, con diferentes tinciones, para detectar acumulación de aluminio y especies reactivas al oxígeno (ROS) entre otros, todo en una solución de pH ácido. Se realizaron diversas pruebas a diferentes concentraciones de aluminio con el fin de discriminar entre líneas o ecotipos sensibles y tolerantes, tanto en de la especie diploides (*B. distachyon* y *B. stacei*) como de la especie alotetraploide (*B. hybridum*).

1.1 Evaluación de la inhibición del crecimiento de la raíz después del tratamiento con Al

El primer síntoma aparente de la toxicidad por aluminio es la inhibición de la elongación de las raíces, como ha sido demostrado previamente por otros autores en diferentes especies vegetales (Kochian 1995).

Para estimar la capacidad de recrecimiento en plantas diploides y alotetraploides, se midió la elongación de la raíz de seis muestras diploides de *B. distachyon* (ABR8, ABR1, ABR9, Bd21, E10 y ABR6), procurando usar muestras variadas de distintos orígenes. También se midió una muestra *B. stacey* (E66) y once muestras alotetraploides *B. hybridum* (M2, M15, M10, HP (Hoyo de Pinares), CB (Cabeza de Buey), M12, M11, E82, GRA788, E80 y E78). Todas las muestras diploides (*Bd* y *Bs*) tratadas con aluminio a 10 μ M mostraron una reducción cercana al 90% del crecimiento de la raíz y el recrecimiento fue nulo a 40 μ M, excepto para la línea *Bd* ABR8 que mostró una reducción de un 30% a 10 μ M y un 47% a 40 μ M. (Figura 16). En seis muestras alotetraploides *Bh* (M12, M11, E82, GRA788, E80 Y E78) se redujo el crecimiento aproximadamente un 75% (10 μ M) y no se observó recrecimiento a 40 μ M, mientras que en cinco muestras alotetraploides (M2, M15, M10, HP y CB) hubo una mínima o nula reducción del crecimiento a 10 μ M y aproximadamente un 55% a 40 μ M (Figura 16, Anexo 1). Se puede observar además una alta asociación entre la coloración de la región del ápice hasta la zona de elongación de la raíz y el porcentaje de reducción del crecimiento de la raíces, tanto en las líneas diploides (*Bd* y *Bs*) como en las muestras alotetraploides (*Bh*). Mientras más oscura (color marrón) es la región del ápice, mayor es la disminución del crecimiento y, al contrario, mientras más claro está el ápice menor es la reducción del crecimiento de la raíz. La línea diploide *Bd* ABR8 y cinco muestras alotetraploides (M2, M15, M10, HP y CB) tuvieron una coloración clara en el ápice de la raíz, mientras que las demás líneas mostraron unas coloración oscura en la raíz. La muestra *Bs* E66 mostró una coloración oscura de la raíz, aunque no tan intensa como las demás muestras de *Bd* y *Bh* que no mostraron recrecimiento. Las raíces de *Bs* aun con menor intensidad de coloración en el ápice no recrecieron después del tratamiento con Al (Figura 16). Las muestras diploides y alotetraploides que mostraron un alto recrecimiento de la raíz después del tratamiento con Al fueron clasificadas como tolerantes, mientras que las muestras con mínimo recrecimiento o sin recrecimiento de la raíz fueron clasificadas como sensibles.



Para demostrar el grado de toxicidad que representa el ión trivalente (Al^{3+}) en un medio a pH ácido se comparó la respuesta de recrecimiento de la raíz con un medio de pH neutro (considerado este último un pH óptimo para el cultivo de las plantas) en las líneas diploides *Bd* ABR1 (sensible) y ABR8 (tolerante). El resultado confirma que a pH ácido el aluminio es tóxico en la línea sensible, contrastado con un pH neutro, la influencia del aluminio a pH ácido inhibe el recrecimiento de la raíz mientras que a pH neutro no genera inhibición ni en la línea sensible ni en la tolerante, ABR1 y ABR8, respectivamente. Además, se observa que las raíces de ABR1 tratadas con Al a pH neutro presentan un color blanco y aspecto sano, igual que las raíces del control sin Al, siendo realmente la toxicidad del aluminio (Al^{3+}) la que desencadena una coloración marrón de la raíz a pH ácido (Figura 17).

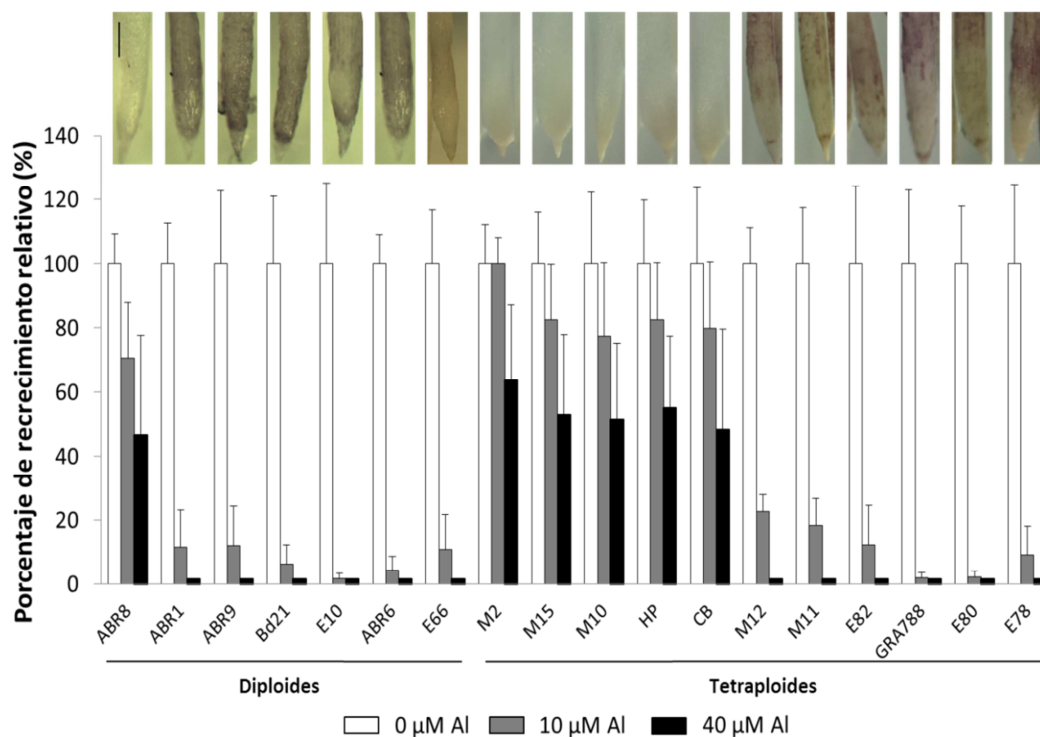


Figura 16: Porcentaje de crecimiento relativo de la raíz de las líneas diploides *Bd* ABR8, ABR1, ABR9, Bd21, E10 y ABR6, además la línea diploide *Bs* E66 y las líneas alotetraploides *Bh* M2, M15, M10, HP (Hoyo de Pinares), CB (Cabeza de Buey), M12, M11, E82, GRA788, E80 y E78, sin Al y con Al a 10 y 40 $\mu\text{M Al}(\text{SO}_4)_2$. Sobre las columnas se observa la apariencia de las raíces de cada muestra después del tratamiento con Al. Ausencia de tinción en las tolerantes y presencia de tinción en las sensibles. La línea de color negro indicada representa 250 μm (escala). Los valores son la media de 16 plantas de dos muestras biológicas distintas.

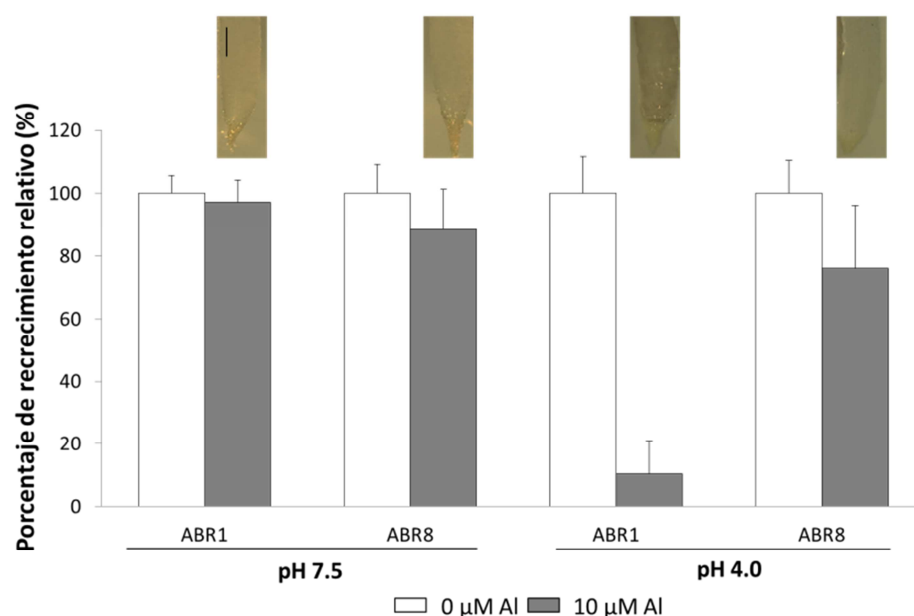


Figura 17. Porcentaje de recrecimiento relativo de la raíz de las líneas diploides *Bd* ABR8 y ABR1 sin Al y con Al a 10 μM $\text{AlK}(\text{SO}_4)_2$ a pH 7,5 y 4,0. Sobre las columnas se observa la apariencia de las raíces de cada muestra después del tratamiento con Al. Ausencia de coloración en la línea tolerante (ABR8) y presencia de color en la sensible (ABR1). La línea de color negro representa 250 μm (escala). Los valores son la media de 16 plantas de dos muestras biológicas distintas.

1.2. Evaluación del crecimiento de la raíz en medio sólido en presencia de Aluminio

Se realizó un ensayo para comprobar el crecimiento de la raíz en medio sólido con Al. Para ello semillas de la línea sensible *Bd* ABR1, de la línea tolerante *Bd* ABR8 y del ecotipo alotetraploide *Bh* CB fueron sembradas in vitro en medio sólido nutritivo. El tubo de cultivo tenía una primera fase (desde la superficie) con medio sin Al y luego medio con Al a diferentes concentraciones 250 y 500 μM . Después de 22 días de cultivo las raíces de las plántulas *Bd* ABR1 (sensible) no consiguieron penetrar en el medio con Al a 250 ni 500 μM desarrollándose su sistema radicular sólo en la fase sin Al, mientras que las raíces de las plántulas de *Bd* ABR8 y *Bh* CB pudieron crecer y sus raíces penetraron en medio con Al sin problemas, siendo más vigoroso el crecimiento en la alotetraploide tolerante *Bh* CB que en la diploide tolerante *Bd* ABR8 (Figura 18).

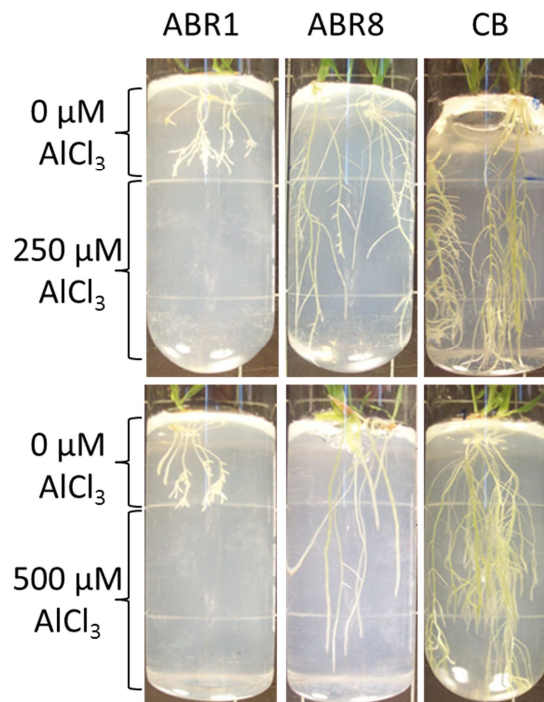


Figura 18. Crecimiento de las raíces de dos líneas diploides *Bd*, una sensible (ABR1) y una tolerante (ABR8), además de una alotetraploide *Bh* tolerante (CB). Se sembraron tres semillas por tubo con una primera fase sin Al y otra fase a una concentración de 250 y 500 μM de AlCl_3 a pH 4,3. Se hicieron tres repeticiones biológicas para el mismo tratamiento.

1.3 Evaluación de la tolerancia al estrés por Al con tinciones histoquímicas

Hay evidencias de que las raíces de plantas sensibles acumulan Al en la región basal de la raíz e incluso en la zona de elongación. Con el fin de estudiar el contenido y la localización del Al en las raíces, tanto de las líneas tolerantes como sensibles, se determinó la presencia de iones Al^{3+} en las raíces mediante el empleo del reactivo Morin (Tice y col. 1992), que presenta una alta especificidad por los iones Al^{3+} y es utilizado habitualmente para detectar aluminio en tejidos de plantas (Larsen y col. 1996, Jones y col. 2006, Ezaki y col. 2007). La acumulación de aluminio en las raíces de *Brachypodium* fue visualizada con la tinción de hematoxilina y la tinción fluorescente con morín. Después del tratamiento con Al, las raíces de la línea diploide sensible *Bd* ABR1 y la línea alotetraploide sensible *Bh* GRA788 se tiñeron intensamente con hematoxilina, mientras las raíces de la línea diploide *Bd* ABR8 y el ecotipo tolerante alotetraploide *Bh* CB no se tiñeron (Figura 19a). Con la tinción de Morín se obtuvieron resultados similares, las raíces de *Bd* ABR1 y *Bh* GRA788 aparecieron intensamente fluorescentes después del tratamiento con Al, mientras las raíces de *Bd* ABR8 y *Bh* CB no mostraron casi fluorescencia (Figura 19b).



Por lo tanto, se infiere que las raíces de *Bd* ABR1 y *Bh* GRA788 acumulan mucho aluminio mientras que *Bd* ABR8 y *Bh* CB no acumulan Al o lo acumulan en muy poca cantidad. Estos resultados están correlacionados con los niveles de inhibición del crecimiento de la raíz, cuanto mayor es la acumulación de Al en la raíz, mayor es la inhibición del crecimiento después del tratamiento con Al.

La muerte celular como consecuencia del tratamiento con Al fue visualizada mediante la tinción con azul de Evans. Las líneas sensibles *Bd* ABR1 y *Bh* GRA788 mostraron una intensa coloración en el ápice, incluyendo la zona de elongación, mientras que las plántulas tolerantes *Bd* ABR8 exhibieron una intensidad muy baja de coloración, salvo una pequeña zona del ápice, y el ecotipo *Bh* CB no mostró prácticamente muerte celular (Figura 19c). La tinción con de azul de anilina para detectar calosa no mostró diferencias entre raíces de plántulas sensibles y tolerantes, tratadas y sin tratar con Al (Figura 19d).

Los niveles diferenciales de aldehídos que llevan a la peroxidación lipídica (LOOH-derivados aldehídos) pueden visualizarse en tejidos de plantas empleando el reactivo de Schiff's (Yamamoto y col. 2001, Han y col. 2008). La peroxidación lipídica puede observarse con el Reactivo de Schiff's. Raíces de las líneas diploides y alotetraploides sensibles que fueron teñidas con el Reactivo de Schiff's desarrollaron un color rosado en el ápice y alrededor de la zona de elongación, coincidiendo con la región teñida con hematoxilina y azul de Evans. Sin embargo, la línea tolerante diploide *Bd* ABR8 y siete ecotipos tetraploides *Bh* tolerantes (CB, Castuera, Aracena, Serradilla, El Molar, HP y Cortegana) no se tiñeron de color rosado (Figura 19e, Anexo 2). En cuanto a la producción de peróxido de hidrógeno (H_2O_2), la tinción fluorescente con DCF-DA también indicó que raíces de *Bd* ABR1 y *Bh* GRA788 (líneas sensibles) producían más H_2O_2 que las raíces de plántulas tolerantes *Bd* ABR8 y *Bh* CB (Figura 19f).

La tinción rojo de rutenio detecta la acumulación de pectinas en las paredes celulares. Se ha observado que las plántulas de la línea tolerante *Bd* ABR8 y la línea sensible *Bd* ABR1 presentan la misma cantidad de pectinas en la raíz con los tratamientos sin Al, sin embargo, al tratarlas con Al hay un aumento de cantidad de pectinas en la línea tolerante ABR8 que no se observa en la línea ABR1 (Figura 19g). En cambio en las líneas alotetraploides, la línea tolerante CB tiene mayor cantidad de pectinas que la línea sensible GRA788 en los tratamientos sin Al, pero al tratarlas con Al la línea sensible GRA788 presenta al parecer la misma cantidad de pectinas que la línea tolerante CB, pero en el ápice de esta última se observa muy poca acumulación (Figura 19g).



La mayoría de las evaluaciones con tinciones histoquímicas, salvo la tinción de Rutenio Rojo, siempre produjeron los mismos resultados: las raíces de ABR1 y GRA788 exhibieron una intensa coloración con las tinciones por ser genotipos sensibles, mientras que raíces de ABR8 y CB no mostraron prácticamente color por ser genotipos tolerantes.

Además, evaluamos, sin ninguna tinción y a ojo desnudo, si la coloración de las puntas de las raíces era clara u oscura en las líneas diploides *Bd* ABR1 y *Bd* ABR8 y alotetraploides *Bh* GRA788 y *Bh* CB, en presencia y ausencia de Al. Los resultados mostraron que las líneas de genotipos sensibles *Bd* ABR1 y *Bh* GRA788 presentaban raíces de coloración muy oscura en presencia de Al, no así las raíces de líneas de genotipos tolerantes *Bd* ABR8 y *Bh* CB que presentaron una coloración igual al control sin Al (Figura 19h). Esta es la primera vez que es posible evaluar “in vitro” la tolerancia al estrés por Al de gramíneas sin usar ningún método de tinción.

Las evaluaciones sin tinción (ojo desnudo), con hematoxilina (acumulación de Al) y con el reactivo de Schiff's (peroxidación lipídica) se llevaron a cabo en todas las líneas diploides (69 líneas *Bd* y 10 líneas *Bs*) y en todas las líneas y ecotipos alotetraploides (38 líneas *Bh*) al igual que los análisis del recrecimiento de las raíces. Todas las plántulas sensibles diploides (68 *Bd* y 10 *Bs*) mostraron en las raíces un color oscuro y sólo las raíces de la línea tolerante *Bd* ABR8 presentaron coloración clara. Todas las raíces de las plántulas alotetraploides sensibles (28 *Bh*) mostraron una tinción oscura, excepto las raíces de las líneas alotetraploides tolerantes (CB, Castuera, Aracena, Serradilla, El Molar, HP, Cortegana, M2, M10 y M15) que mostraron raíces claras (Figura 20a,b,c).

También se llevaron a cabo pruebas de tolerancia aumentando la concentración de Al a 40 µM. Las raíces de la línea tolerante *Bd* ABR8 sufrieron un ligero cambio de coloración a oscuro pero menos intenso que el observado en las raíces de la línea sensible *Bd* ABR1. El cambio de coloración de las raíces de *Bd* ABR8 a una concentración mayor de Al coincide con el aumento de la inhibición del recrecimiento de la raíz según la Figura 16. Sin embargo, las raíces de la línea alotetraploide tolerante *Bh* Cortegana siguieron siendo igual de claras (Figura 20d).

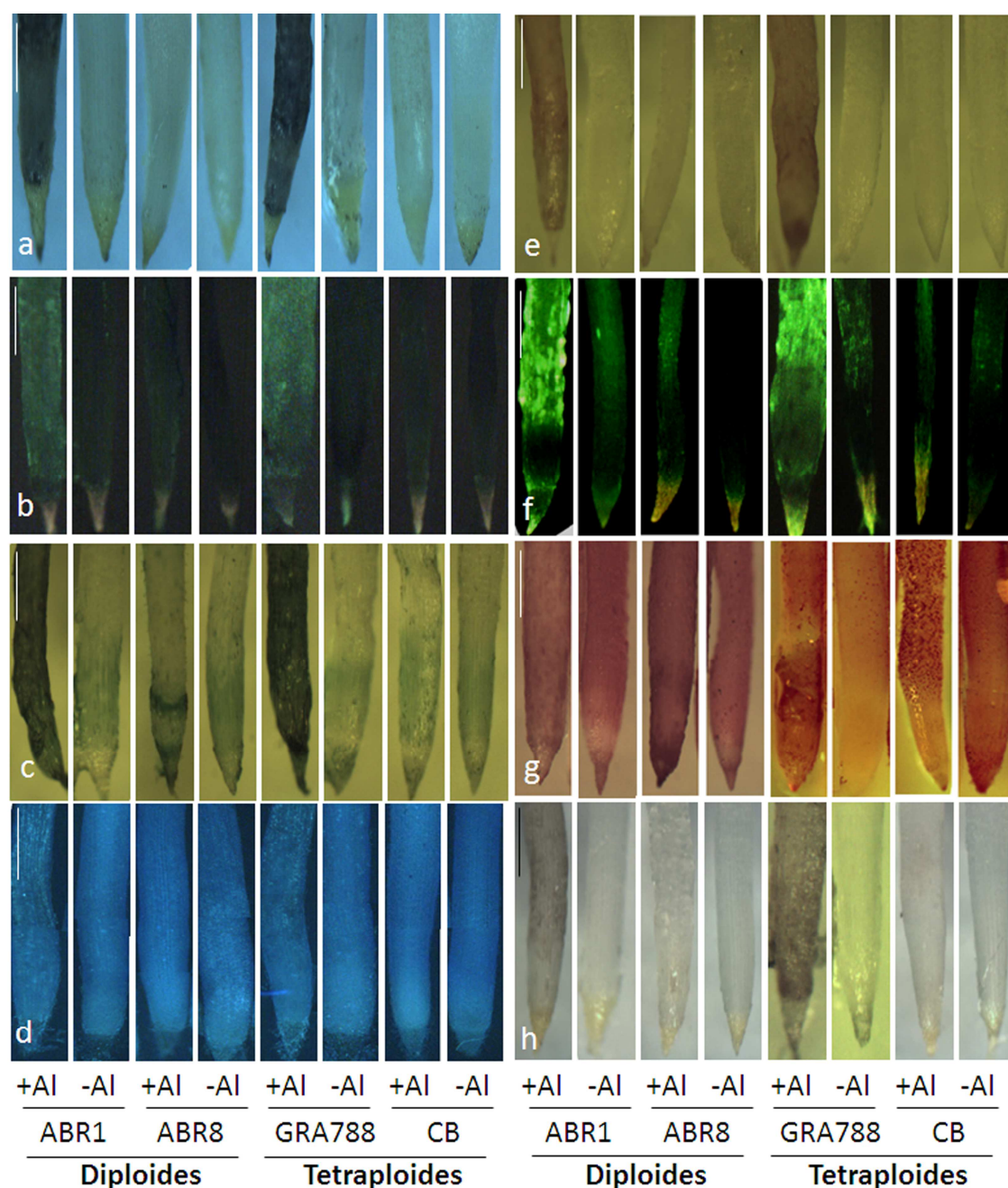


Figura 19. Raíces de líneas diploides sensible (ABR1) y tolerante (ABR8), de líneas alotetraploides sensible (GRA788) y tolerante (CB), sin tratar y tratadas con $AlK(SO_4)_2$ a 10 μM (pH 4,0). Las raíces fueron teñidas con Hematoxilina (a) y Morín (b) para observar acumulación de Al; Azul de Evan's (c) para detectar muerte celular; Azul de anilina (d) para detectar calosa; Reactivo de Schiff's (e) para ver peroxidación lipídica; DCF-DA (f) para detectar peróxido de hidrogeno, Rojo de rutenio (g) para detectar acumulación de pectinas y raíces sin aplicar ninguna tinción (h). Se hicieron 5 repeticiones por línea en cada tratamiento. La barra representa 250 μm (escala).

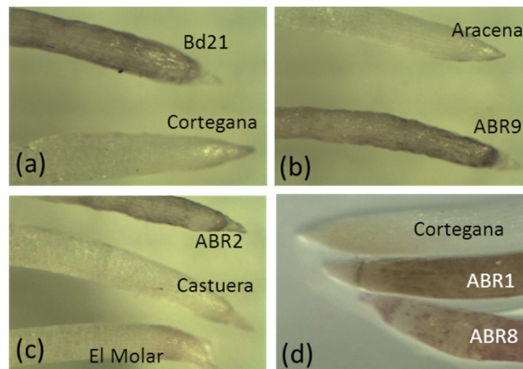


Figura 20. Ejemplo de coloración de las raíces sin utilizar ninguna tinción después del tratamiento con $\text{AlK}(\text{SO}_4)_2$ a $10 \mu\text{M}$ (pH 4,0). Las raíces de las líneas diploides sensibles Bd21, ABR2 y ABR9 tienen un color oscuro y las raíces de los ecotipos alotetraploides tolerantes Cortegana, Castuera, El Molar y Aracena tienen un color claro (a,b,c). A una concentración de $40 \mu\text{M}$, las raíces de ABR8 comienzan a tener una coloración más oscura aunque menos intensa que ABR1, y la alotetraploide tolerante Cortegana continúa con una raíz de coloración clara (d).

2. Cuantificación de ácidos orgánicos

Tampoco existe información en el género *Brachypodium* sobre los mecanismos de defensa para contrarrestar el efecto del Al en suelos ácidos. En muchas especies vegetales se ha demostrado que uno de los mecanismos más extendidos es la exudación de ácidos orgánicos por las raíces.

2.1. Cuantificación de ácidos orgánicos por el método enzimático

Las exudaciones de los ácidos orgánicos se estimaron en las raíces de las líneas diploides *Bd* ABR1 y *Bd* ABR8 y en las líneas alotetraploides *Bh* GRA788 y *Bh* CB. En general se observa que entre las líneas sensibles y tolerantes de las líneas diploides y alotetraploides existen diferencias en las cantidades de exudado de málico en 3 y 24 horas (Figura 21). Después de 3 horas del tratamiento con Al (AlCl_3 a $20 \mu\text{M}$) la cantidad de malato exudada por las raíces de las líneas tolerantes diploide *Bd* ABR8 y la alotetraploide *Bh* CB fue aproximadamente 4,5 y 9 veces mayor que la exudada en las líneas sensibles *Bd* ABR1 y *Bh* GRA788, respectivamente. Después de 24 horas con Al la cantidad de malato exudado por las raíces de la línea tolerante *Bd* ABR8 fue 6,2 veces mayor que en la línea sensible *Bd* ABR1, y en la alotetraploide tolerante fue 6,3 veces mayor que en la línea sensible *Bh* GRA788 (Figura 21). Por lo tanto, en las líneas tolerantes (*Bd* ABR8 y *Bh* CB) hay mucho más malato que en las líneas sensibles después del tratamiento con Al (*Bd* ABR1 y *Bh* GRA788). Las líneas diploides y alotetraploides no se inducen

de 3 a 24 horas con Al, debido a que ninguna llega a tener al menos ocho veces más de malato de 3 hasta 24 horas, por lo tanto, presentan un modelo constitutivo de exudación.

Por otro lado, en cuanto a la exudación de citrato, en general se observa que sólo una línea se induce (*Bd* ABR8) y tres líneas (*Bd* ABR1, *Bh* GRA788 y *Bh* CB) no se inducen de 3 a 24 horas en solución con Al (Figura 22). Después de 3 horas de tratamiento con Al (AlCl_3 a $20 \mu\text{M}$) la cantidad de citrato exudada por las raíces de la línea tolerantes diploide ABR8 fue casi el doble (1,8 veces) que en la línea sensible *Bd* ABR1 y en el ecotipo alotetraploide *Bh* CB fue similar al de la línea sensible *Bh* GRA788. Después de 24 horas con Al, la cantidad de citrato exudada por las raíces de la línea tolerante *Bd* ABR8 fue 28 veces más que la exudada por la línea sensible *Bd* ABR1, y en la alotetraploide tolerante fue el doble que la sensible. Sin embargo, la diferencia observada en entre las líneas alotetraploides no es significativa (Figura 22). Por lo tanto, entre las líneas diploides se observa una clara diferencia en la exudación de citrato a 24 horas, siendo mucho mayor en la tolerante *Bd* ABR8 comparada con la sensible *Bd* ABR1, mientras que no hay diferencias significativas en las cantidades de exudado de citrato entre las líneas alotetraploides, el tolerante *Bh* CB y la línea sensible *Bh* GRA788.

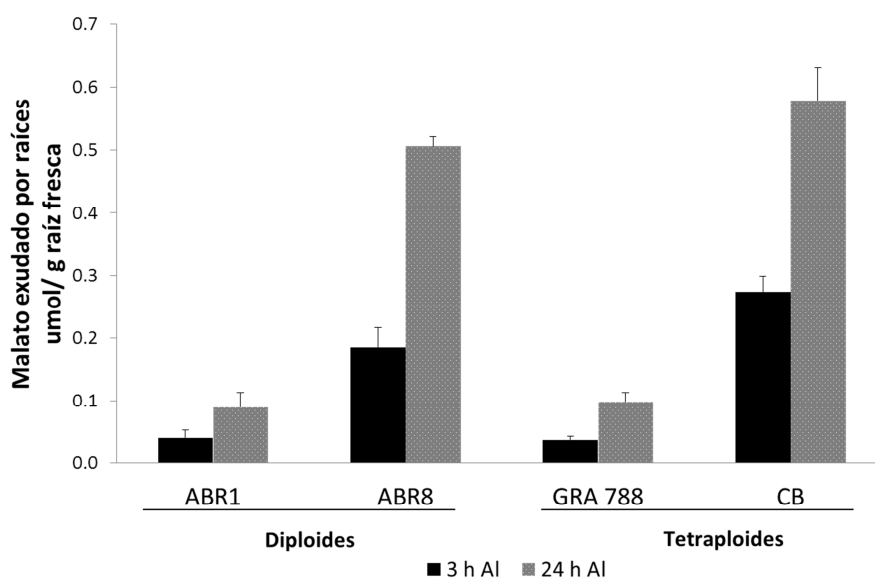


Figura 21. Cuantificación de ácido málico a partir de exudado de raíz a 3 y 24 h en las líneas de *Bd* sensible (ABR1) y tolerante (ABR8), y en las líneas alotetraploides *Bh* sensible (GRA788) y tolerante (CB). Los valores son la media de tres repeticiones, cada repetición tiene 20 plántulas. Se trataron con $20 \mu\text{M}$ AlCl_3 .

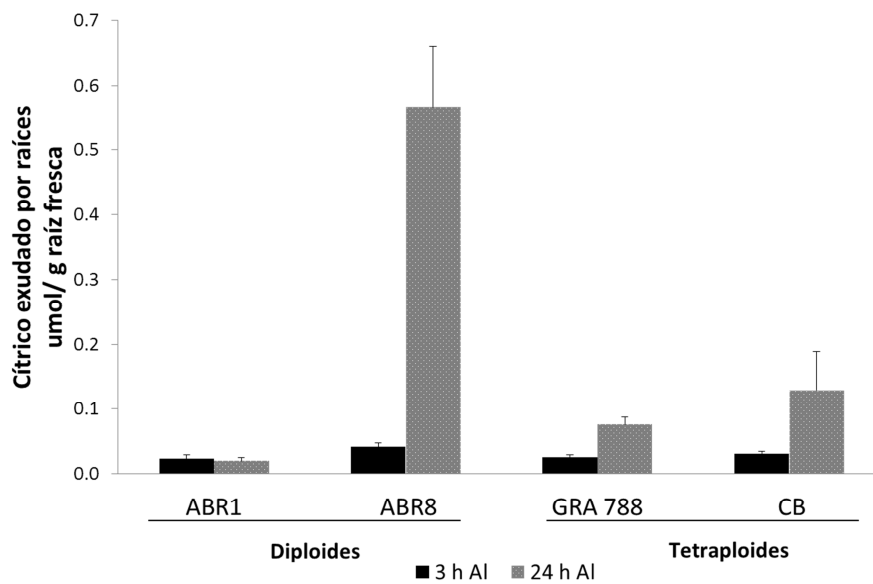


Figura 22. Cuantificación de ácido cítrico a partir de exudado de raíz a 3 y 24 h en las líneas de *Bd* sensible (ABR1) y tolerante (ABR8), y en las líneas alotetraploides *Bh* sensible (GRA788) y tolerante (CB). Los valores son la media de tres repeticiones, cada repetición contiene 20 plántulas. Se trataron con 20 μM AlCl_3 .

2.2. Cuantificación de ácidos orgánicos por RP-HPLC

Debido a la gran diferencia que mostraron las cantidades de malato entre muestras tolerantes y sensibles, tanto diploides como tetraploides, con el método enzimático, se decidió realizar una prueba más precisa de la cuantificación de malato de exudados de raíz por cromatografía líquida de alta resolución de fase reversa (RP-HPLC). En general el análisis de los datos muestra claramente una diferencia entre las cantidades de malato entre genotipos tolerantes y sensibles, detectándose cantidades significativas de malato sólo en los genotipos tolerantes. Además, se observa que sólo se detecta malato en cantidades significativas en genotipos tolerantes al tratarlos con Al, no así en genotipos tolerantes y sensibles sin tratar (sin Al), en los cuales no se detecta malato. En la línea sensible diploide *Bd* ABR1 y alotetraploide *Bh* GRA788 no se detectó malato en ninguno de los tratamientos, sin embargo, en la línea tolerante diploide *Bd* ABR8 y el ecotipo alotetraploide tolerante *Bh* CB se detectó malato tanto a 3 h como a 24 h, siendo un poco mayor a la última hora, esto nos indica que el malato empieza a ser exudado desde el inicio del tratamiento con Al. Al igual que en el método enzimático la secreción de malato fue constitutiva en ABR8 y en CB (Figura 23).

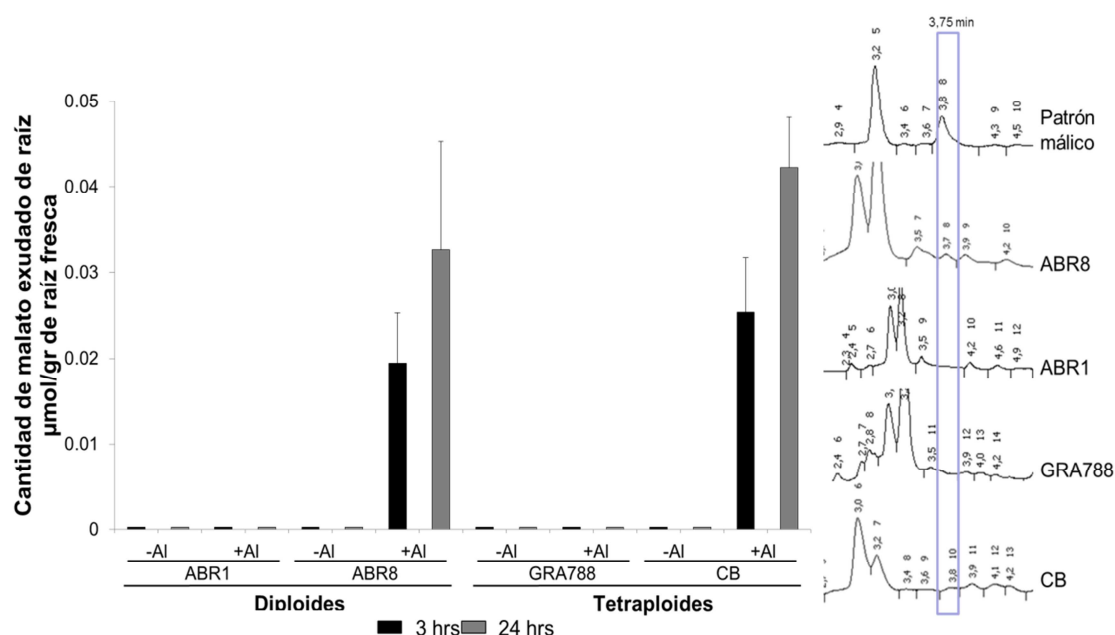


Figura 23. Cuantificación de malato a partir de exudado de raíz mediante RP-HPLC en líneas diploides (ABR8 y ABR1) y alotetraploides (GRA788 y CB), sin Al y con Al (AlCl_3 a $20 \mu\text{M}$) a 3 y 24 h (en el gráfico de la izquierda). Los valores son la media de tres repeticiones, cada repetición contiene 20 plántulas. A la derecha, cromatograma de muestras de exudados de raíz (ABR8, ABR1, GRA788 y CB) comparados con el patrón de malato que detectó la presencia a 3,75 min.

3. Análisis de secuencias

La forma en la que el Al produce fitotoxicidad en los vegetales y los mecanismos de resistencia desarrollados por la plantas aún no se conocen con claridad. Existe una serie de genes que podrían estar potencialmente involucrados en los procesos de defensa de las plantas frente al estrés por aluminio. Con el fin de conocer mejor la respuesta a este tipo de estrés en *Brachypodium*, se escogieron para este estudio varios genes candidatos que podrían estar potencialmente implicados en la tolerancia.

A partir de diversas secuencias de ADNc o EST de genes candidatos de tolerancia al aluminio descritos previamente en monocotiledóneas y en menor medida en dicotiledóneas, se buscaron (blast) genes ortólogos en *Brachypodium*, usando como base de datos la secuencia completa de la especie modelo *Brachypodium distachyon*, línea Bd21.

Los genes candidatos de tolerancia al aluminio se agruparon de acuerdo a su función en diferentes categorías: genes para proteínas de membrana transportadoras de ácidos orgánicos, genes de factores de transcripción implicados en la expresión de genes transportadores de ácidos orgánicos, genes de enzimas del metabolismo de los ácidos



orgánicos (ciclo de Krebs), genes de estrés oxidativo y genes relacionados con componentes de la pared celular y del tonoplasto.

En el primer grupo, se seleccionaron seis genes relacionados con el transporte de ácidos orgánicos, tres de la familia *ALMT* (transporte de málico) y tres de la familia *MATE* (transporte de cítrico). De la familia *ALMT*, se seleccionó el primer gen de tolerancia aislado en trigo y más estudiado, el gen *TaALMT1* (Delhaize et al 2004), que posee ortólogos en centeno (*ScALMT1*) y en *Arabidopsis* (*AtALMT1*). Además, se estudiaron otros dos genes de la familia *ALMT* de arroz. De la familia *MATE*, se estudiaron tres genes, el gen *MATE1* que confiere tolerancia en cebada (*HvAACT1=HvMATE1*), centeno (*ScMATE1=ScFRDL1*) y en otras especies vegetales y, el gen *MATE2* (*ScFRDL2*) que parece estar involucrado en la tolerancia en centeno y un último gen *MATE* propio de *Brachypodium* llamado *BdMATE3* del cual no existe información sobre su contribución a la tolerancia al estrés por Al.

También se estudió el gen de un factor de transcripción que induce, entre otros, la expresión de genes de transportadores de ácidos orgánicos (*ALMT1* y *MATE1*) en *Arabidopsis*, el gen *STOP1*. El gen *STOP1* tiene un equivalente funcional en arroz, el gen *ART1* (Yamaji y col. 2009).

El segundo grupo de genes elegidos procedía de genes de enzimas del metabolismo de los ácidos orgánicos (ciclo de Krebs) responsables de la biosíntesis de los ácidos orgánicos, málico y cítrico, siendo estos *MDH1* (málico deshidrogenasa mitocondrial), *MDH2* (málico deshidrogenasa mitocondrial), *FH* (Fumarasa mitocondrial), *CS* (citrato sintetasa mitocondrial) y *ME* (enzima málica).

Un tercer grupo de genes está relacionado con el estrés oxidativo, genes que codifican enzimas que eliminan especies reactivas de oxígeno (ROS), específicamente dos genes de superóxido dismutasa (SOD), uno dependiente de cobre/zinc (*Cu/ZnSOD*) y otro dependiente de manganeso (*MnSOD*).

El cuarto grupo de genes se estudió por estar relacionados con la pared celular: un gen de pectin metilesterasa (*PME*) que se induce en maíz pos estrés con Al (Schnable y col. 2009) y varios genes de Xiloglucan endotransglucosilasa hidrolasa (*XTH*) cuya expresión cambia en *Arabidopsis* por tratamiento con Al (Yang y col. 2011). El último gen seleccionado fue un gen de arroz (*tDT*) del tonoplasto de la vacuola cuya función también se ha relacionado con la tolerancia al estrés por Al (Tanaka y col. 2010).

Los resultados de la búsqueda de los transcritos ortólogos de estos genes en *Brachypodium distachyon* y, por tanto, la lista de genes seleccionados para estudiar los cambios de su expresión por el tratamiento con Al en *Bd* y *Bh* se encuentra en la Tabla 12.



Tabla 12: Nombre de los transcritos seleccionados en *Brachypodium distachyon* a partir de genes candidatos de tolerancia al aluminio o relacionados con la tolerancia de otras especies. Se observa el porcentaje de identidad del transcrito *Bd* calculado con distintas plataformas computacionales disponibles en la red.

Función	Gen	% Identidad en <i>Brachypodium</i> ⁽¹⁾	E-value ⁽¹⁾	Transcrito <i>Brachypodium</i>	Nombre propuesto	Nº Exones	Nº Intrones
Transportador de membrana	<i>TaALMT1</i>	81	0,0	BRADI5G09690.1	<i>BdALMT1</i>	5	4
	<i>Os06g0268800</i>	84	0,0	BRADI1G43810.1	<i>BdALMT2</i>	6	5
	<i>Os10g0572100</i>	86	0,0	BRADI3G33980.1	<i>BdALMT3</i>	6	5
	<i>Sc, Hv, Sb MATE1</i>	88, 88, 83	0,0	BRADI1G69770.1	<i>BdMATE1</i>	12	11
	<i>ScFRDL2</i>	87	0,0	BRADI3G23150.1	<i>BdMATE2</i>	13	12
	<i>BdMATE</i>	---	---	BRADI3G02170.2	<i>BdMATE3</i>	14	13
Metabolismo ácidos orgánicos (C. Krebs)	<i>HvMDH1</i>	89	0,0	BRADI2G15740.1	<i>BdMDH1</i>	7	6
	<i>HvMDH2</i>	91	0,0	BRADI2G45200.1	<i>BdMADH2</i>	7	6
	<i>HvFH</i>	93	0,0	BRADI2G33450.1	<i>BdFH</i>	17	16
	<i>HvCS</i>	92	0,0	BRADI3G06930.1	<i>BdCS</i>	19	18
	<i>HvME</i>	91	0,0	BRADI2G33450.1	<i>BdME</i>	2	1
Estrés oxidativo	<i>ScCSOD1</i>	92	0,0	BRADI1G18340.1	<i>BdSOD1</i>	8	7
	<i>ScCSOD2</i>	92	0,0	BRADI1G18340.3	<i>BdSOD2</i>	7	6
	<i>ScMSOD1</i>	91	0,0	BRADI2G30580.1	<i>BdMSOD</i>	6	5
Componentes de la pared celular	<i>ScPME</i>	90	0,0	BRADI5G12300.1	<i>BdPME</i>	2	1
	<i>AtXTH5</i>	73 ⁽²⁾	6,5e-7 ⁽²⁾	BRADI4G16990.1	<i>BdXTH5</i>	3	2
	<i>AtXTH14</i>	81 ⁽²⁾	1,3e-20 ⁽²⁾	BRADI1G33810.1	<i>BdXTH14</i>	3	2
	<i>AtXTH15</i>	72 ⁽²⁾	1,3e-20 ⁽²⁾	BRADI1G33840.1	<i>BdXTH15</i>	3	2
	<i>AtXTH31</i>	66	8e-30	BRADI1G27867.1	<i>BdXTH31</i>	3	2
Otros	<i>ZmSTOP1</i>	80	0,0	BRADI2G56320.1	<i>BdSTOP1</i>	1	0
	<i>OstDT</i>	88	0,0	BRADI4G33550.1	<i>BdtDT</i>	6	5

(1) Blast en GenBank

(2) Blast Brachypodium (www.phytozome.net)



4. Análisis de expresión génica en *Brachypodium*

Hasta el momento no existe información de cambios en los niveles de expresión de ARNm de genes candidatos de tolerancia al estrés por Al en *Brachypodium*, aunque si se conocen dichos cambios en otras especies de Poaceas tales como trigo, centeno, cebada, avena y arroz entre otras. Dicho estudio se realizó mediante RT-PCR *semicuantitativa* y RT-PCR *cuantitativa* y para ello fue necesario diseñar cebadores específicos para los transcritos de los genes candidatos de tolerancia al estrés por Al en *Brachypodium*.

Teniendo en cuenta que los estudios mediante RT-PCR- *semicuantitativa* (RT-PCR *semiq*) ofrecen resultados cualitativos que permiten detectar cambios de expresión fácilmente observables, se decidió comenzar con este tipo de estudios con el fin de evaluar los cambios del patrón de expresión para cada uno de los genes seleccionados. Además, estos análisis iniciales nos permitirían comprobar la especificidad de las parejas de “primers” empleadas. En todos los casos, se observó un solo amplicón y del tamaño esperado.

Posteriormente, se llevaron a cabo los análisis mediante RT-PCR *cuantitativa* (RT-PCR q), evaluando en primer lugar, la eficiencia de cada pareja de cebadores. En todos los casos se estudió la expresión de los ARNm en raíz y hoja de líneas sensibles y tolerantes, diploides y tetraploides, sin tratar y tratadas con Al.

4.1. Análisis de expresión génica de transportadores de malato (*BdALMT*) y citrato (*BdMATE*).

Mediante RT-PCR *semiq* y *cuantitativa* se midieron los niveles relativos de ARNm de siete genes candidatos diferentes de tolerancia al estrés por Al (*BdALMT1*, *BdALMT2*, *BdALMT3*, *BdMATE1*, *BdMATE2*, *BdMATE3* y el factor de transcripción *BdSTOP1*). Se analizaron los cambios en raíz y hoja de plantas diploides sensibles *Bd* ABR1 y tolerantes *Bd* ABR8 y en plantas alotetraploides tolerantes *Bh* CB, en ausencia de Al y tratadas con 20 μ M de Al durante 24 horas. Además, se hizo una RT-PCR *cuantitativa* del gen *ALMT1* con cebadores específicos para cada genotipo (*Bd* y *Bs*) de plántulas alotetraploides (*Bh*) tolerantes *Bh* CB y sensibles *Bh* GRA788.

Antes de las RT-PCR q se hicieron estudios de RT-PCR *semiq* de los genes de las familias *BdALMT*, *BdMATE* y el factor de transcripción *BdSTOP1*.

En los estudios de expresión RT-PCR *semi-q* de la familia *ALMT*, se puede observar que los transcritos de *BdALMT1* se expresan principalmente en raíces y no en hojas, tanto en la línea sensible (*Bd* ABR1) como en las tolerantes diploide (*Bd* ABR8) y alotetraploide (*Bh* CB). En cambio, la expresión del gen *BdALMT2* es semejante en ambos tejidos en *Bd* y más intensa en hojas en *Bh*. La expresión del gen *BdALMT3* es más intensa en las hojas que en las raíces en las dos especies, *Bd* y *Bh* (Figura 24a). También se observa una mayor cantidad del ARNm de *BdALMT1* en las líneas tolerantes que en la sensible y, en la línea sensible *Bd* ABR1 se produce una inducción como consecuencia del tratamiento con Al en la raíz.

En las líneas alotetraploides se usaron cebadores específicos para distinguir la expresión del gen *ALMT1* de cada genomio parental (*Bd* y *Bs*). En la alotetraploide tolerante *Bh* (CB) se observaron más transcritos en la raíz que en la hoja, tanto del gen *BdALMT1* como del *BsALMT1*, sin embargo, en la alotetraploide sensible se pueden observar transcritos en la raíz pero también se observan transcritos en la hoja, sobre todo en el tratamiento sin Al (Figura 24b).

En los genes de la familia *BdMATE*, se puede observar en las líneas diploides *Bd* (ABR1 y ABR8) que hay más transcritos de los genes *BdMATE1* y *BdMATE2* en raíces que en las hojas. Sin embargo, en la alotetraploide *Bh* CB hay más transcritos de *BdMATE1* en raíz que en hoja. Para los transcritos de *BdMATE2*, en la alotetraploide *Bh* CB, se observa que en los dos tejidos hay una expresión similar, variando un poco la expresión por el tratamiento. Por otro lado, en las dos especies, *Bd* y *Bh*, los transcritos de *BdMATE3* se expresan más en la hoja que en la raíz.

El factor de transcripción *BdSTOP1* tiene un modelo de expresión constitutivo en las dos especies, tanto en raíz como en hoja. El ARNm empleado como control interno (18S) tuvo un modelo de expresión constitutivo en las dos especies (Figura 24a).

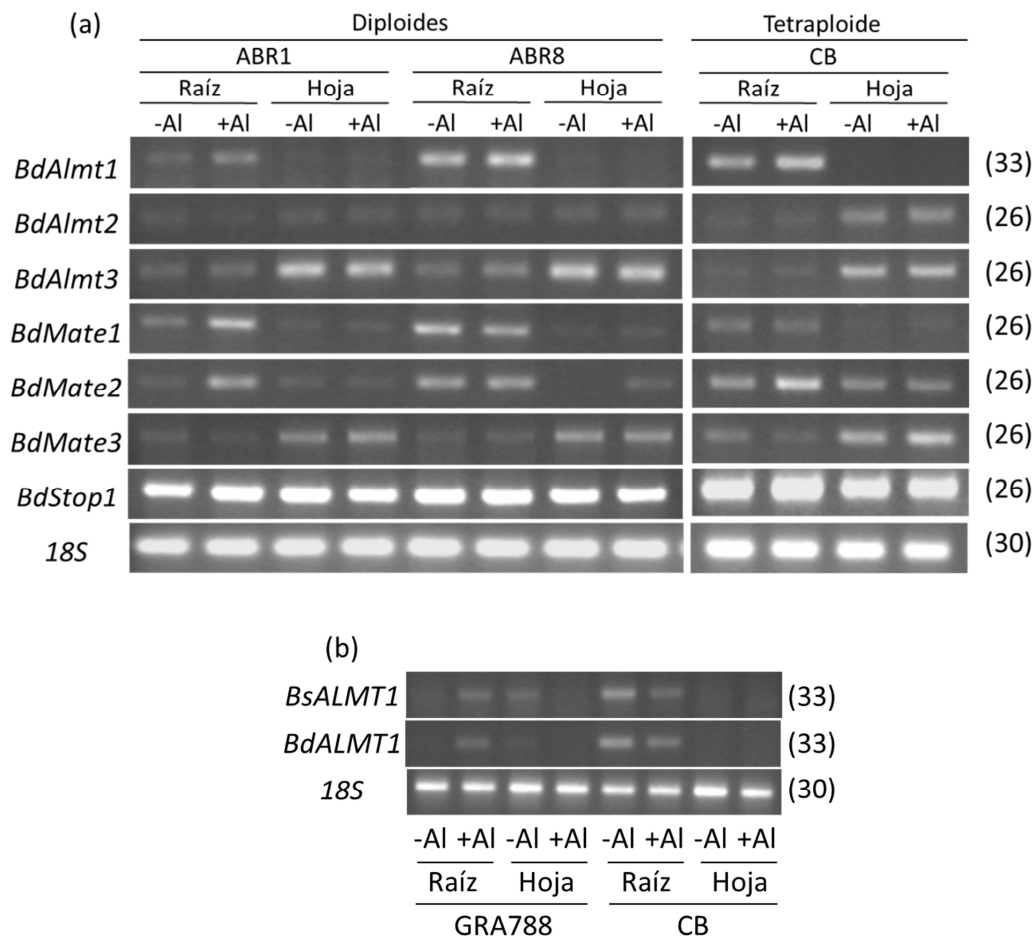


Figura 24. Patrones de expresión temporal de raíz y hoja mediante RT-PCR *semicuantitativa* de transcritos de las líneas sensible diploide *Bd* ABR1 y la línea tolerante *Bd* ABR8, y alotetraploide tolerante *Bh* CB y sensible *Bh* GRA788, en ausencia (-Al) y presencia (+Al) de $\text{AlK}(\text{SO}_4)_2$ a 20 μM durante 24 horas. Se observa la expresión de los ARNm de tres genes *BdALMT*, tres genes *BdMATE*, el factor de transcripción *BdSTOP1*, y el control interno *18S* en *Bd* ABR1, *Bd* ABR8 y *Bh* CB (a). Patrones de expresión del gen *ALMT1* en dos genomas distintos *B. stacei* y *B. distachyon* de los alotetraploides (*Bh*) sensible GRA788 y tolerante CB (b). Al lado derecho de cada figura se detallan los ciclos asignados a cada gen para la RT-PCR. Las RT-PCR semicuantitativas representan pruebas idénticas de dos replicas biológicas.

Los resultados obtenidos mediante RT-PCRq permitieron estimar las cantidades relativas de los mensajeros de los genes candidatos entre tratamientos, tejidos y líneas sensibles y tolerantes. Con respecto a la expresión del gen *BdALMT1* en líneas diploides, las plántulas tolerantes *Bd* ABR8 tienen cuatro veces más transcritos en la raíz que en la hoja en los tratamientos sin Al, mientras que en los tratamientos con Al la diferencia es del doble. La línea sensible *Bd* ABR1 tiene igual cantidad de transcritos en raíz y en hoja en los tratamientos sin Al, mientras que en las plántulas tratadas hay tres veces más transcritos en la raíz que en las hojas. Por otro lado, en la raíz de la línea sensible *Bd* ABR1 se observa una inducción de la expresión de transcritos al tratarlas con Al, no así en la línea tolerante *Bd* ABR8 que muestra una ligera represión. Si se compara la cantidad de transcritos presentes en la raíz en las líneas diploides entre tolerante y sensible, se observa que *Bd* ABR8 tiene diez veces y el doble de transcritos más que ABR1 en los tratamiento sin y con Al, respectivamente (Figura 25a).

En cuanto a la expresión del gen *BdALMT1* en plantas alotetraploides, la línea tolerante *Bh* CB tienen 100 veces más transcritos en la raíz que en la hoja en los tratamientos sin Al, mientras que en los tratamientos con Al la diferencia es de 119 veces. La línea sensible *Bh* GRA788 tiene el doble de transcritos en hoja que en raíz en los tratamientos sin Al, mientras que en plántulas tratadas con Al hay 46 veces más transcritos en raíz que en hoja. Además, al igual que en las líneas diploides, en la línea alotetraploide sensible *Bh* GRA788 se observa una inducción de los transcritos de la raíz al tratarlas con Al, no así en el ecotipo alotetraploide tolerante *Bh* CB que tiene un modelo de expresión prácticamente constitutivo (Figura 25b). Si se compara la cantidad de transcritos presentes en la raíz en las líneas alotetraploides entre tolerante y sensible, se observa que *Bh* CB tiene 23 veces más transcritos que *Bh* GRA788 en los tratamientos sin Al, y en las tratadas la diferencia es del doble. Para la expresión del gen *BsALMT1* en plantas alotetraploides el modelo de expresión es similar al de *BdALMT1*, las plantas la línea tolerante *Bh* CB tienen 33 veces más transcritos en la raíz que en la hoja en los tratamientos sin Al, mientras que en los tratamientos con Al la diferencia es de 17 veces más en la raíz. La línea sensible *Bh* GRA788 tiene cinco veces más transcritos en hoja que en raíz en los tratamientos sin Al, mientras que en plántulas tratadas hay casi tres veces más transcritos en raíz que en hoja. Si se compara la cantidad de transcritos presentes en la raíz en las líneas alotetraploides entre tolerante y sensible, se observa que *Bh* CB tiene 13 veces más transcritos que *Bh* GRA788 en los tratamientos sin Al, y en las tratadas con Al las cantidades de transcritos son similares. Al igual que en el modelo de expresión del gen *BdALMT1*, la expresión del gen *BsALMT1* de la línea alotetraploide sensible *Bh* GRA788 se induce en las raíces al tratarlas con Al, mientras que en la línea tolerante *Bh* CB no se induce (Figura 25c).

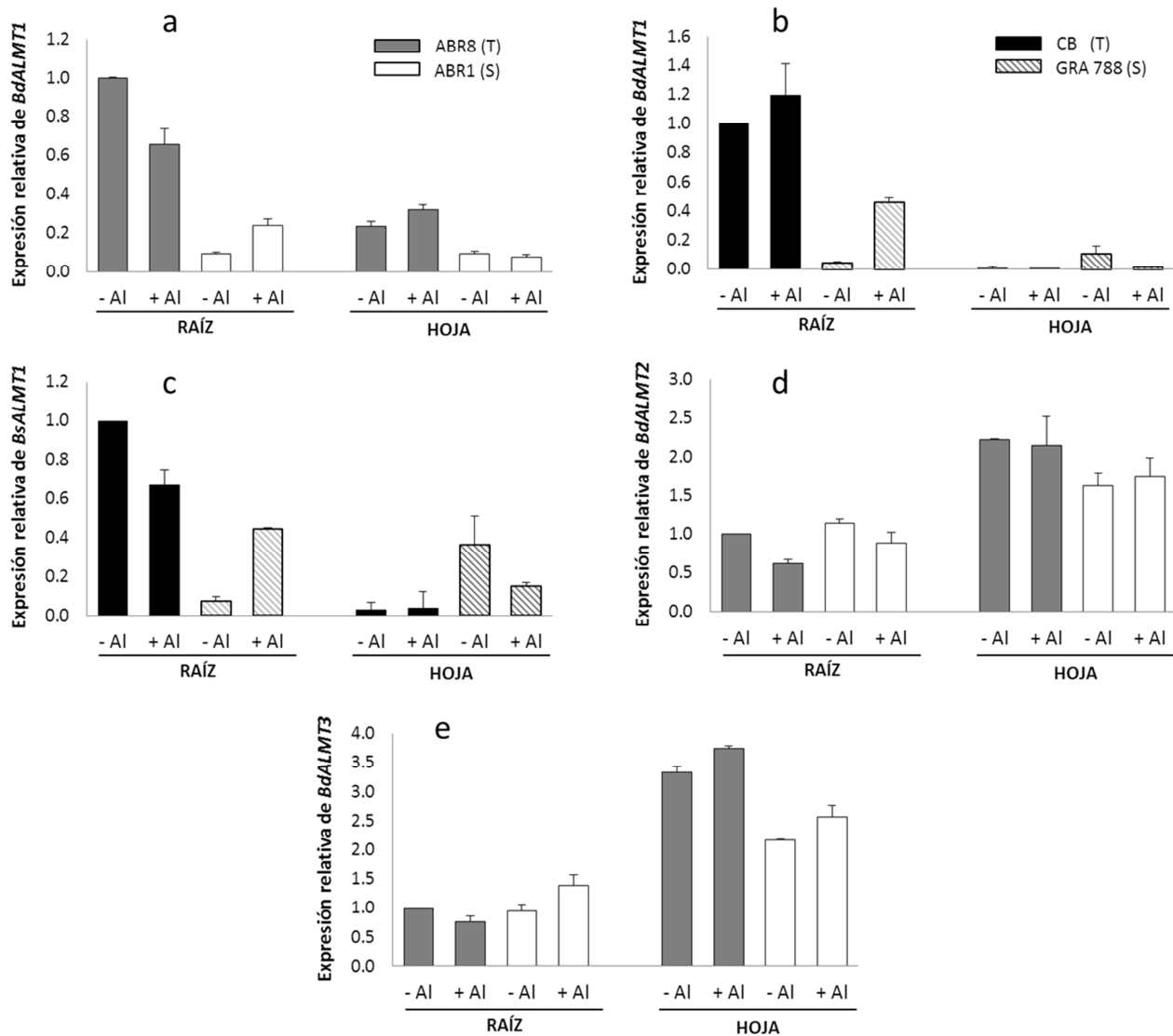


Figura 25. Los resultados muestran los patrones de expresión temporal mediante RT-PCR *cuantitativa* en raíces y hojas de la línea diploide *Bd* sensible ABR1 y la línea tolerante *Bd* ABR8, también de las allotetraploides *Bh* sensible GRA788 y la *Bh* tolerante CB en ausencia (-Al) y presencia (+Al) de $\text{AlK}(\text{SO}_4)_2$ a 20 μM durante 24 horas. Se observan los niveles de expresión de los ARNm de los genes en diploides *BdALMT1* (a), en allotetraploides *BdALMT1* (b) y *BsALMT1* (c), además en diploides de los genes *BdALMT2* (d) y *BdALMT3* (e). Los datos fueron normalizados con el control interno *18S*. Las diferencias de expresión relativa en cada columna están comparadas, en el caso de las líneas diploides, con el genotipo tolerante ABR8 y, en las allotetraploides, con el genotipo tolerante CB, en ambos casos sin Al. Las columnas representan el promedio de dos replicas biológicas por tratamiento.

Los ARNm de los genes *BdALMT2* y *BdALMT3* aparecen en mayor cantidad en las hojas que en las raíces de las líneas diploides *Bd* y alotetraploides *Bh*. No se observan grandes diferencias en las cantidades de estos mensajeros entre las líneas sensibles y tolerantes diploides *Bd* y tampoco se detectan cambios claros como consecuencia del tratamiento con Al, no se observa ni inducción ni represión (Figura 25d,e).

De acuerdo con la Figura 26a, la cantidad de transcritos de *BdMATE1* en la línea diploide *Bd* tolerante ABR8 es de casi siete veces más en la raíz que en la hoja en los tratamientos sin Al, y en las plántulas tratadas la diferencia es del triple, mientras que en la línea sensible *Bd* ABR1 hay tres veces más transcritos en raíz que en hoja en los tratamientos sin Al, y en plántulas tratadas esta diferencia sube más de cinco veces. Una diferencia importante es la cantidad de transcritos en la raíz entre tolerante y sensible, así ABR8 (tolerante) tiene el doble de transcritos que ABR1 (sensible) en las raíces de las plántulas sin tratar, mientras que la diferencia es a la inversa al tratarlas, ya que ABR1 ahora tiene el doble que ABR8. De esta forma, los transcritos de *BdMATE1* en la raíz de ABR8 se reprimen el doble tratándolas con Al, mientras que en ABR1 tienden a inducirse.

Las diferencias en los patrones de expresión del ARNm del gen *BdMATE2* (Figura 26b) entre tolerantes y sensibles son similares a las del gen *BdMATE1*. La línea ABR8 tiene más del doble de transcritos de *BdMATE2* en raíz que en hoja en los tratamientos sin y con Al, mientras en la línea ABR1 la cantidad de transcritos es similar entre raíz y hoja en el tratamiento sin Al, pero aumenta la diferencia a cinco veces en raíz comparada con hoja cuando es tratada con Al. Hay tres veces más transcritos de *BdMATE2* en ABR8 que en ABR1 en raíces sin tratar, y en las raíces tratadas, la cantidad de transcritos es igual en las dos líneas, de esta forma, los transcritos de ABR1 se inducen más de tres veces al tratar con Al, mientras que en ABR8 el modelo de expresión es constitutivo.

Hay una similitud en general en las cantidades de transcritos en los dos genes, *BdMATE1* y *BdMATE2*, siendo mayor las cantidades en raíz que en hoja, variando de acuerdo al tratamiento entre tolerante y sensible. Sin embargo, el gen *BdMATE3* escapa a este modelo, tiene una expresión muy diferente al haber más transcritos en hoja que en raíz, tanto en la línea tolerante como en la sensible. Observándose lo mismo mediante RT-PCR *semi-q* en la alotetraploide tolerante *Bh* CB. Según la Figura 26c la cantidad de transcritos del gen *BdMATE3* es entre el doble y cinco veces mayor en hoja que en raíz, tanto en la línea tolerante como en la sensible, sin y con Al. Por lo tanto, el transcrito *BdMATE3* se expresan más en hoja, lo que difiere de los genes *BdMATE1* y *BdMATE2* que se expresan más en raíz.



Según Liu y col. (2009) el gen *AtSTOP1* es el factor de transcripción necesario para potenciar la transcripción de los genes *AtALMT* y *AtMATE* en *Arabidopsis*. La cantidad de transcritos del gen *BdSTOP1* en general es igual en raíz y en hoja en las líneas tolerante ABR8 y sensible ABR1, no sufriendo cambios de expresión significativos entre raíces no tratadas y tratadas, salvo al parecer un ligero aumento en la raíz en la línea sensible ABR1 al tratarla con AI, que no llega a ser del doble (Figura 26d) y que no consideramos significativo.

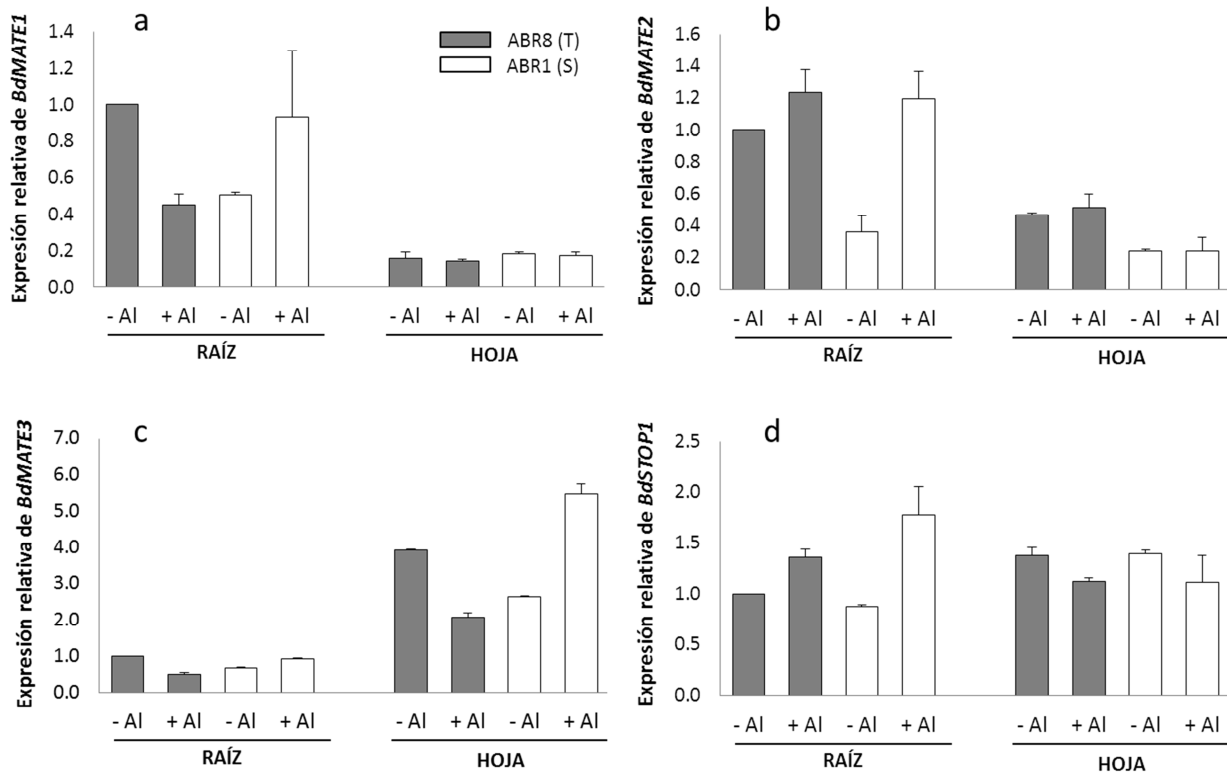


Figura 26. Los resultados muestran los patrones de expresión temporal mediante RT-PCR cuantitativa en raíces y hojas de la línea diploide *Bd* sensible ABR1 y la línea tolerante *Bd* ABR8 en ausencia (-AI) y presencia (+AI) de $\text{AlK}(\text{SO}_4)_2$ a 20 μM durante 24 horas. Se observan los niveles de expresión de los ARNm de los genes *BdMATE1* (a), *BdMATE2* (b), *BdMATE3* (c) y *BdSTOP1* (d). Los datos fueron normalizados con el control interno 18S. Las diferencias de expresión relativa en cada columna están comparadas con el genotipo tolerante ABR8 sin AI. Las columnas representan el promedio de dos replicas biológicas por tratamiento.

4.2 Análisis de expresión de genes nucleares que codifican para enzimas de localización subcelular mitocondrial relacionadas con la producción de ácidos orgánicos en el ciclo de Krebs.

Hemos analizado algunos genes nucleares que codifican para enzimas de localización subcelular mitocondrial del ciclo de Krebs que tienen relación con la producción de ácidos orgánicos como málico deshidrogenasa (*BdMDH1* y *BdMDH2*), Fumarasa (*BdFH*) y Citrato sintasa (*BdCS*). También hemos estudiado un gen relacionado con la producción de piruvato, que codifica para la enzima málica dependiente de NADP (*BdME*) de localización citoplasmática.

En relación a la expresión del ARNm del gen *BdMDH1* en líneas diploides, la línea tolerante *Bd* ABR8 tiene el doble de transcritos en la raíz que en la hoja en los tratamientos sin Al, mientras que en los tratamientos con Al no hay diferencias entre raíz y hoja. La línea sensible *Bd* ABR1 tiene seis veces más transcritos en raíz que en hoja en los tratamientos sin Al, mientras que en las plántulas tratadas con Al no se aprecian diferencias entre raíz y hoja. Por otro lado, en la raíz de la línea sensible *Bd* ABR1 se observa una fuerte represión de casi cinco veces al tratarlas con Al y también hubo represión en la línea tolerante *Bd* ABR8 pero fue de dos veces. Si se compara la cantidad de transcritos presentes en la raíz en las líneas diploides *Bd* entre tolerante y sensible, se observa que ABR8 tiene menos transcritos que ABR1 en los tratamientos sin Al, diferencia que no llega a ser el doble, mientras que la cantidad de transcritos cuando son tratadas con Al es igual tanto en ABR8 como en ABR1 (Figura 27a). Para el caso de los ARN mensajeros de los genes *BdMDH2*, *BdFH* y *BdCS* los cambios de expresión tanto en la línea tolerante como en la línea sensible, en raíz y hoja, son muy parecidos a lo descrito para *BdMDH1*, habiendo algunas diferencias de cantidades relativas de transcritos según el gen considerado. En todos los casos el tratamiento con Al produce una represión o disminución de la cantidad de transcritos. (Figura 27b, c, d). En cuanto al gen citoplasmático *BdME*, no existen diferencias claras y significativas de expresión entre línea sensible y tolerante, ni entre hoja y raíz, incluso en los tratamientos con Al, habiendo una expresión uniforme y constitutiva de los mensajeros (Figura 27e).

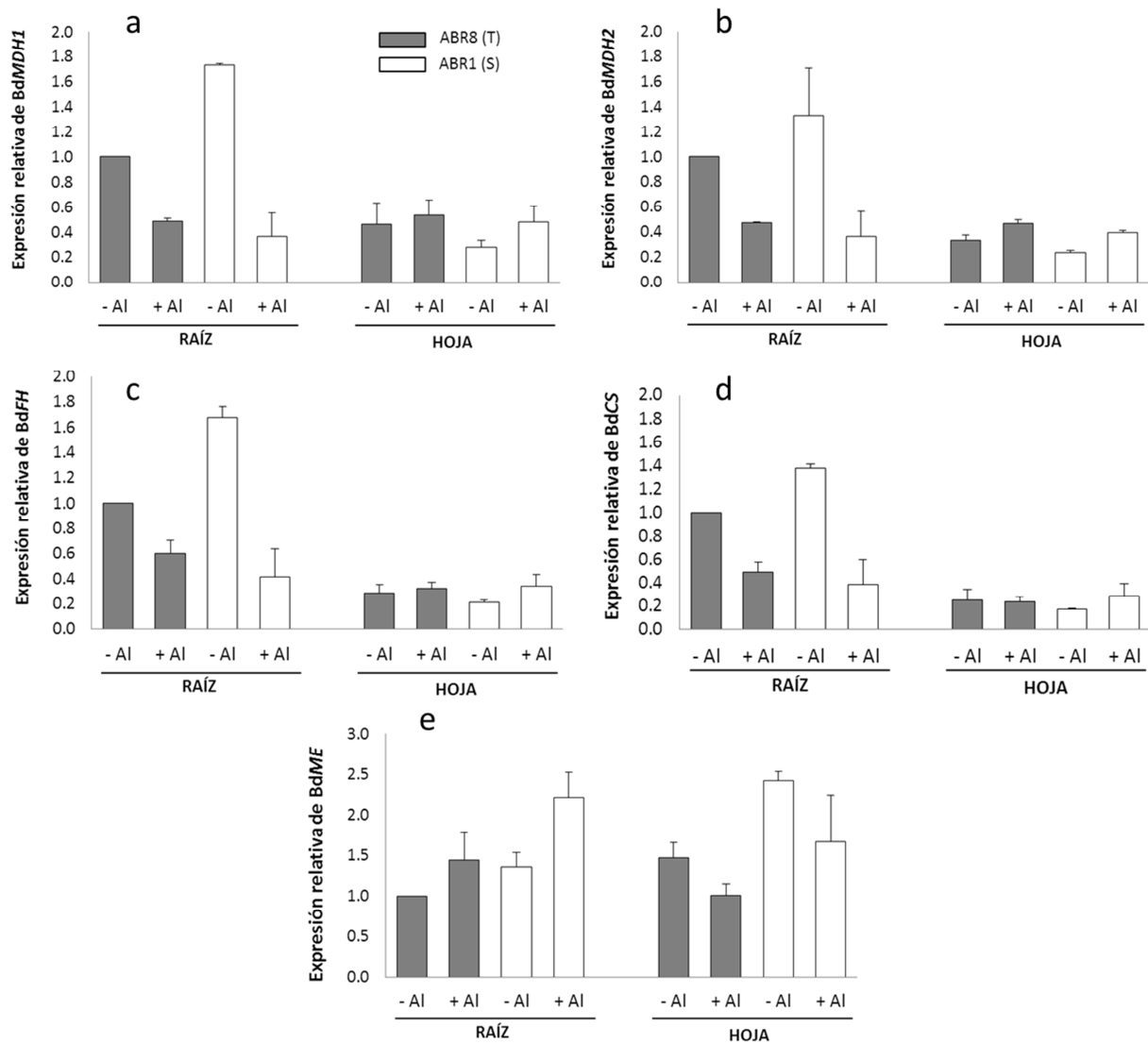


Figura 27. Los resultados muestran los cambios en la expresión temporal mediante RT-PCR cuantitativa de diversos genes en tejidos de raíz y hoja de la línea diploide *Bd* sensible ABR1 y la línea tolerante *Bd* ABR8 en ausencia (-Al) y presencia (+Al) de $\text{AlK}(\text{SO}_4)_2$ a 20 μM durante 24 horas. Se observan los niveles de expresión de los ARNm de los genes *BdMDH1* (a), *BdMDH2* (b), *BdFH* (c), *BdCS* (d) y *BdME* (e). Los datos fueron normalizados con el control interno *18S*. Las diferencias de expresión relativa en cada columna están comparadas con el genotipo tolerante ABR8 sin Al. Las columnas representan el promedio de dos replicas biológicas por tratamiento.

4.3. Análisis de expresión de genes de superóxido dismutasa (SOD) involucrados en la eliminación de especies reactivas de oxígeno (ROS).

Se hicieron estudios de expresión de dos genes de *SOD*, dos de *Cu/ZnSOD* (*BdCSOD1* y *BdCSOD2*) y uno de *MnSOD* (*BdMSOD1*). Los ARN mensajeros de los dos genes de *Cu/ZnSOD* (*BdCSOD1* y *BdCSOD2*) muestran prácticamente el mismo patrón de expresión. Las líneas diploides *Bd* ABR8 y ABR1 muestran una expresión constitutiva, sin cambios notables debidos al tratamiento con Al. Si se analiza la cantidad de transcritos de ambos genes, las plántulas de ABR8 tienen tres veces más transcritos en la raíz que en la hoja en los tratamientos sin Al, mientras que en las plántulas tratadas con Al la diferencia es más del doble. En las plántulas de ABR1 la diferencia es mayor que en las de ABR8, hay seis veces más transcritos en los tratamientos sin Al en raíz que en hoja, mientras que en las plántulas tratadas con Al hay más de tres veces (Figura 28a, b). Para el caso del ARNm del gen *BdMSOD1* las diferencias de expresión entre hoja y raíz no se detectan como en los genes de *BdCSOD1* y *BdCSOD2*. En ABR8 hay prácticamente la misma cantidad de transcritos en hoja y raíz en los dos tratamientos, sin embargo en ABR1 se observa el doble de transcritos en raíz que en hoja, tanto en plántulas tratadas como no tratadas (Figura 28c).

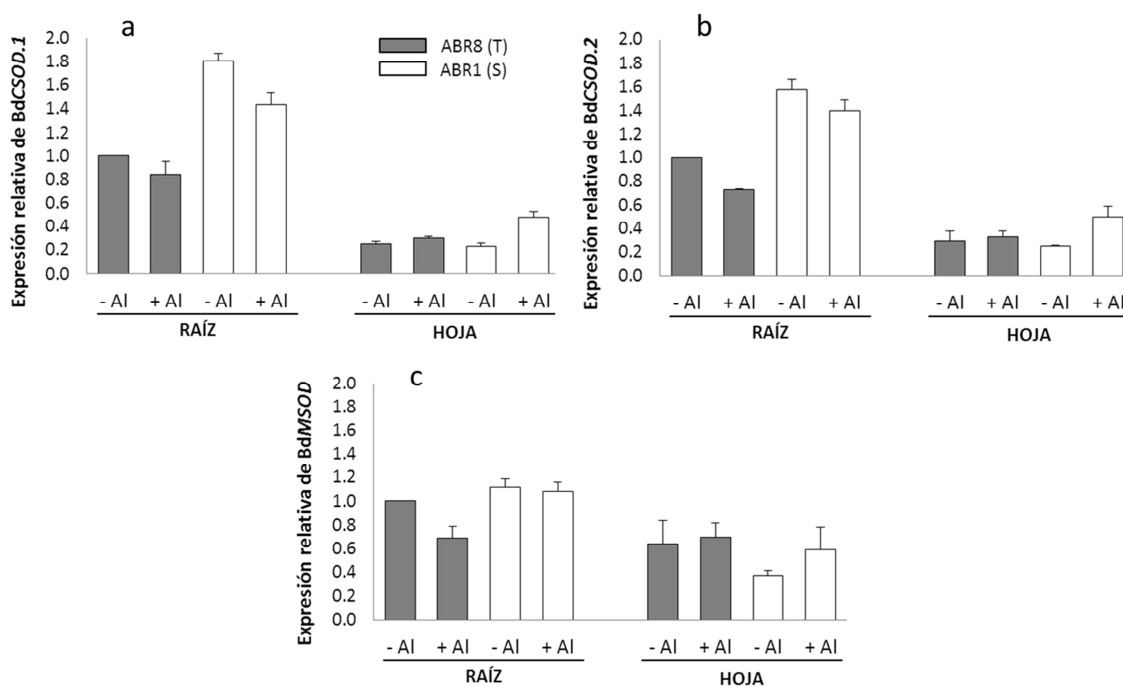


Figura 28. Los resultados muestran los patrones de expresión temporal mediante RT-PCR cuantitativa en raíces y hojas de la línea diploide *Bd* sensible ABR1 y la línea tolerante *Bd* ABR8 en ausencia (-Al) y presencia (+Al) de $\text{AlK}(\text{SO}_4)_2$ a 20 μM durante 24 horas. Se observan los niveles de expresión de los ARNm de los genes *BdCSOD1* (a), *BdCSOD2* (b) y *BdMSOD1* (c). Los datos fueron normalizados con el control interno 18S. Las diferencias de expresión relativa en cada columna están comparadas con el genotipo tolerante ABR8 sin Al. Las columnas representan el promedio de dos replicas biológicas por tratamiento.



4.4 Análisis de expresión de genes involucrados en el mantenimiento de la pared celular.

Cuando las plantas son expuestas al aluminio, la pared celular es el primer sitio de contacto con el aluminio. Las pectinas son el principal componente de la pared celular en bacterias, hongos y plantas. Las pectin metilesterasas (*PME*) son enzimas que modifican el grado de metilesterificación de las pectinas. La acción de las *PME* modifica la estructura de las pectinas de la pared celular, y estas modificaciones están asociadas con cambios de pH y estrés, entre otros. Se ha demostrado que más del 85% del aluminio se acumula en la pared celular en cebada y el alga *Chara corallina* (Clarkson, 1997 y Taylor y col. 2000). El Al afecta a la pared celular, disminuyendo su extensibilidad. Aunque hay una batería de enzimas que regulan la extensión de la pared celular, se considera que las xiloglucan endotransglucosilasa hidrolasas (*XTHs*) son agentes importantes que controlan la resistencia y extensibilidad de la pared celular (Rose y col. 2002). Por tal motivo, se han estudiado los cambios en la expresión de los ARN mensajeros de genes que codifican para estas enzimas.

Según la Figura 29, para el caso de la expresión del gen *BdPME* se puede observar que hay transcritos en la raíz sólo en ABR8 y muy poco en la hoja en las dos líneas, y de manera individual que el transcrito *BdPME* se reprime en la raíz de la línea tolerante ABR8 al tratarlas con Al. Sin embargo, en ABR1 prácticamente no se detecta expresión en ninguno de los dos tejidos.

En los genes de la familia *XTH* (Figura 29) se pueden observar diferentes niveles de expresión de los mensajeros correspondientes. Hay tres genes que parecen expresarse más en raíz que en hoja (*BdXTH5*, *BdXTH14* y *BdXTH31*) y un cuarto gen que se expresa más en hoja que en raíz (*BdXTH15*). El ARNm del gen *BdXTH5* se reprime en las raíces de la líneas sensibles (diploide y alotetraploide) y su expresión no cambia (es constitutiva) en las raíces de las tolerantes (diploide y alotetraploide). En las líneas diploides los genes *BdXTH14* y *BdXTH31* tienen distinto nivel de expresión entre sensible y tolerante, en la línea sensible ABR1 estos genes se inducen en la raíz, mientras que en la tolerante la expresión es muy baja, de hecho la línea tolerante tiene más transcritos en la hoja que la raíz del gen *BdXTH14*. En las líneas alotetraploides los genes *BdXTH14* y *BdXTH31* tienen al parecer igual nivel de expresión, siendo su expresión constitutiva en la raíz tanto en la línea sensible (GRA788) como en la tolerante (CB), no habiendo prácticamente expresión en las hojas.

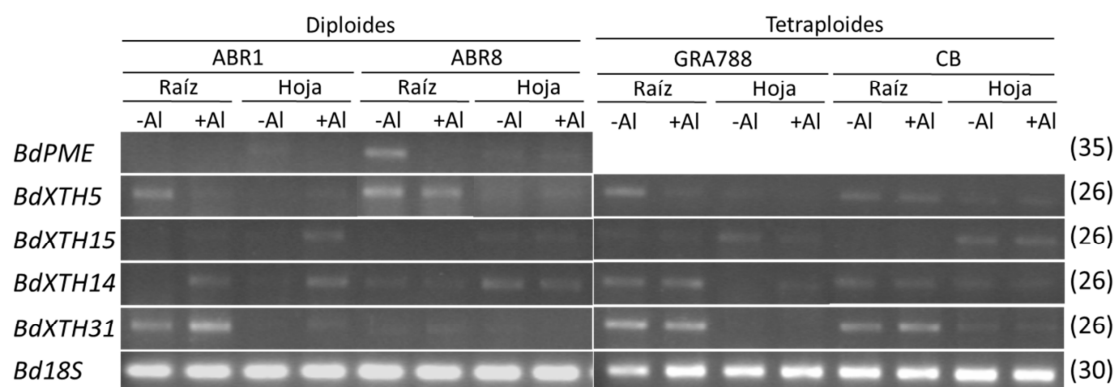


Figura 29. Patrones de expresión en raíz y hoja mediante RT-PCR semicuantitativa de las líneas sensible diploide *Bd* ABR1 y la línea tolerante *Bd* ABR8, y alotetraploide tolerante *Bh* CB y sensible *Bh* GRA788, en ausencia (-Al) y presencia (+Al) de $AlK(SO_4)_2$ a 20 μ M durante 24 horas. Se observa la expresión del ARNm del gen *BdPME* y de cuatro ARNm de genes *BdXTH* (*BdXTH5*, *BdXTH15*, *BdXTH14* y *BdXTH31*), además del control interno *18S*. Al lado derecho de cada figura se detallan los ciclos asignados a cada gen para la RT-PCR. Las RT-PCR semicuantitativas representan pruebas idénticas de dos replicas biológicas.

4.5 Análisis de expresión génica del transportador de dicarboxilato del tonoplasto.

El malato juega un papel fundamental en la protección de las plantas que sufren toxicidad por Al. Según estudios hechos en *Arabidopsis* (Emmerlich y col. 2003, Kovermann y col. 2007) un gen transportador de malato de las vacuolas (*AttdT*, transportador de dicarboxilato del tonoplasto) está encargado de regular la homeostasis de malato citosólica. A continuación se describen los cambios en la expresión de los ARN mensajeros de un transportador de malato vacuolar en *Brachypodium* (*BdtDT*). Este gen tiene prácticamente el mismo modelo de expresión en la líneas diploides *Bd* ABR8 y ABR1, en las dos líneas los transcritos de raíz se reprimen aproximadamente cinco veces al tratarlas con aluminio, se observa además que en las dos líneas hay más transcritos en la raíz que en la hoja en los tratamientos sin Al, aproximadamente el doble, pero cuando las plántulas son tratadas con Al, la cantidad de transcritos es semejante en raíz y en hoja (Figura 30).

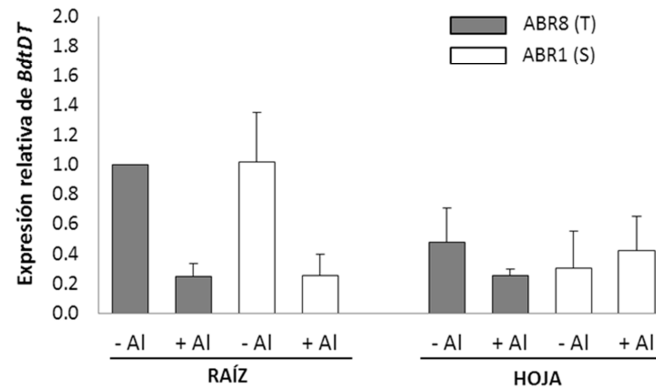


Figura 30. Los resultados muestran el patrón de expresión temporal mediante RT-PCR cuantitativa del gen *BdtTD* en tejidos de raíz y hoja de la línea diploide sensible *Bd* ABR1 y la línea tolerante *Bd* ABR8 en ausencia (-Al) y presencia (+Al) de $\text{AlK}(\text{SO}_4)_2$ a 20 μM durante 24 horas. Los datos fueron normalizados con el control interno *18S*. Las diferencias de expresión relativa en cada columna están comparadas con el genotipo tolerante ABR8 sin Al. Las columnas representan el promedio de dos replicas biológicas por tratamiento.

4.6 Análisis de la región codificante y de las secuencias flanqueantes de los genes *BdALMT1*, *BdMATE1* y *BdMATE2*.

4.6.1 Caracterización de la región codificante del gen *BdALMT1* en *Brachypodium*.

Teniendo en cuenta el diferente patrón de expresión de los ARN mensajeros del gen *BdALMT1* en las raíces de las líneas diploides *Bd* sensible ABR1 y tolerante ABR8, y sabiendo que este gen es el ortólogo de los genes *TaALMT1* de trigo y *ScALMT1* de centeno que confieren tolerancia al estrés por Al en dichas especies, se decidió secuenciar la región codificante del gen *BdALMT1* en estas dos líneas. También se secuenció la región codificante del gen *BsALMT1* en la línea diploide *Bs* E66 (*B. stacei*), para buscar variación en el gen *ALMT1* entre los genomas de *Bd* y *Bs* parentales de *B. hybridum* y, poder estudiar la expresión de los genes *BdALMT1* y *BsALMT1* por separado en las líneas alotetraploides *Bh* sensible GRA788 y tolerante CB, diseñando cebadores específicos.

La secuencia completa del ADN genómico de los genes *BdALMT1* y *BsALMT1* de las líneas diploides *Bd* ABR1, ABR8 y *Bs* E66 fueron obtenidas usando tres parejas de cebadores específicos para amplificar tres segmentos solapados. Los resultados de secuenciación indican que los genes *BdALMT1* y *BsALMT1* tienen cinco exones y cuatro intrones (ver secuencia completa en Anexo 3). En la Figura 31 se puede observar la región codificante del gen *BdALMT1* de las líneas ABR8 y ABR1, y el gen *BsALMT1* de la línea E66, junto con la secuencia de referencia de la línea diploide Bd21. Al comparar las líneas *Bd* sensibles ABR1 y Bd21 con la línea *Bd* tolerante ABR8 se observaron dos SNPs de diferencia en la región codificante del gen *BdALMT1*. Sin embargo, cuando se comparó la secuencia de la especie *B. distachyon* (*BdALMT1*) con la de *B. stacei* (*BsALMT1*) se encontraron una gran cantidad de polimorfismos (54 SNPs y dos Indel), muchos de ellos en el exón 1 (23 SNPs y 2 Indel) (Tabla 13).

Las hipotéticas proteínas codificadas por los genes *BdALMT1* de las líneas sensible ABR1 y tolerante ABR8 se diferenciaron en dos aminoácidos. Sin embargo, entre las proteínas hipotéticas de *Bd* y *Bs* se observaron 21 posiciones con aminoácidos diferentes y 17 aminoácidos adicionales en *Bs* (Figura 32).

Para resumir la variabilidad entre el gen *BdALMT1* y el gen *BsALMT1* en distintas líneas sensibles y tolerante *Bd* y una línea *Bs* se creó un cuadro resumen en el que es posible observar el número de Indel y SNPs que las diferencian (Tabla 13). En los exones entre las líneas diploides sensible (ABR1) y la línea tolerante (ABR8) se detectaron dos SNPs, uno en el exón 1 y otro en el exón 5, con respecto a los intrones se observaron cinco SNPs y un Indel. Al comparar la línea diploide *B. stacei* (E66) con las dos líneas de *B. distachyon* (ABR1 y ABR8) se detectaron 54 SNPs y 2 Indel en los exones y 122 SNPs y 27 Indel en los intrones (Tabla 13).

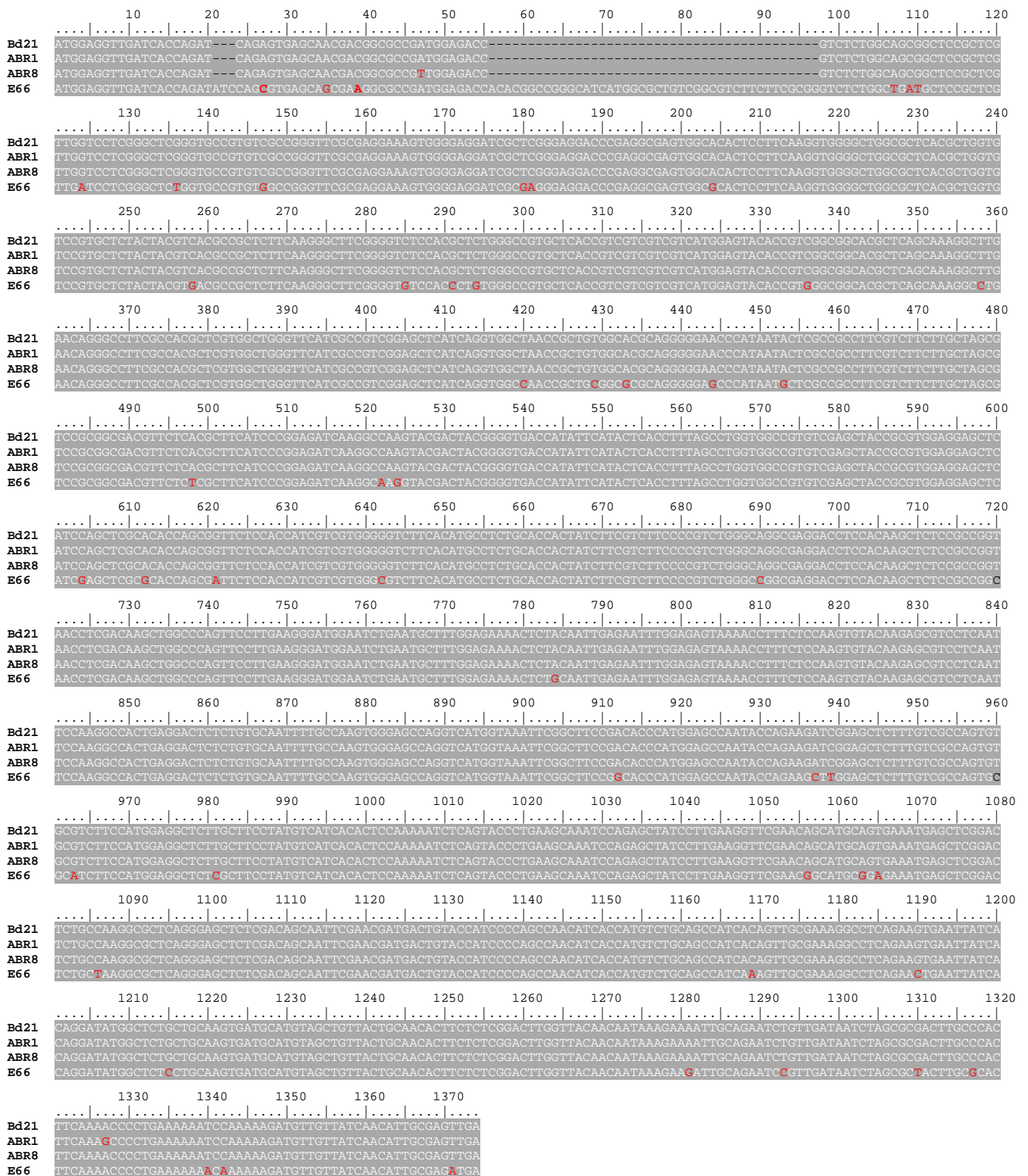


Figura 31. Secuencia de la región codificante del gen *BdALMT1* de las líneas diploides *Bd* sensibles Bd21 (referencia), ABR1 y la línea tolerante ABR8 y, del gen *BsALMT1* de la línea diploide *Bs* E66.

	10	20	30	40	50	60	70
Bd21	MEVDHQR	VSNDGADGD	-----	LWQRLRSLVLGLGCRVAGFARKVGR	IAREDP	RRVAHS	
ABR1	MEVDHQR	VSNDGADGD	-----	LWQRLRSLVLGLGCRVAGFARKVGR	IAREDP	RRVAHS	
ABR8	MEVDHQR	VSNDGAVGD	-----	LWQRLRSLVLGLGCRVAGFARKVGR	IAREDP	RRVAHS	
E66	MEVDHQISSVSSE	GADGDHTAGHHGAVGVFFAGLWLM	LRSL	LGLW	CRVAGFARKVGR	IAREDP	RRVAHS
	80	90	100	110	120	130	140
Bd21	FKVGLALTLVSVLYYVTP	LFKGF	GVSTLWAVLTVVVVMEYTVGGT	LSKGLNRAFATLVAGF	IAVGAHQVA		
ABR1	FKVGLALTLVSVLYYVTP	LFKGF	GVSTLWAVLTVVVVMEYTVGGT	LSKGLNRAFATLVAGF	IAVGAHQVA		
ABR8	FKVGLALTLVSVLYYVTP	LFKGF	GVSTLWAVLTVVVVMEYTVGGT	LSKGLNRAFATLVAGF	IAVGAHQVA		
E66	FKVGLALTLVSVLYYVTP	LFKGF	GVSTLWAVLTVVVVMEYTVGGT	LSKGLNRAFATLVAGF	IAVGAHQVA		
	150	160	170	180	190	200	210
Bd21	NRCGTQGEPIILA	AFVFL	LLASAATFSR	FIPEIKAKYDYGV	TIFILTFSLVAVSSYRVEELIQLAHQRFST		
ABR1	NRCGTQGEPIILA	AFVFL	LLASAATFSR	FIPEIKAKYDYGV	TIFILTFSLVAVSSYRVEELIQLAHQRFST		
ABR8	NRCGTQGEPIILA	AFVFL	LLASAATFSR	FIPEIKAKYDYGV	TIFILTFSLVAVSSYRVEELIQLAHQRFST		
E66	NRCGAQGEPIIM	LA	AFVFL	LLASAATFSR	FIPEIKARYDYGV	TIFILTFSLVAVSSYRVEELIQLAHQRFST	
	220	230	240	250	260	270	280
Bd21	IVVGVTCLCTTIFVFPVWAGEDLHKLSAGNLDKLAQFLE	GMESECFGENSTIENLES	KTFLQVYKSVLN				
ABR1	IVVGVTCLCTTIFVFPVWAGEDLHKLSAGNLDKLAQFLE	GMESECFGENSTIENLES	KTFLQVYKSVLN				
ABR8	IVVGVTCLCTTIFVFPVWAGEDLHKLSAGNLDKLAQFLE	GMESECFGENSTIENLES	KTFLQVYKSVLN				
E66	IVVGVTCLCTTIFVFPVWAGEDLHKLSAGNLDKLAQFLE	GMESECFGENSAI	ENLES	KTFLQVYKSVLN			
	290	300	310	320	330	340	350
Bd21	SKATEDSLCNFAKWE	PGHGKFGFRHPWSQYQKIGALCRQCASSMEALASYVITLQKSQYPEANPELSLKV					
ABR1	SKATEDSLCNFAKWE	PGHGKFGFRHPWSQYQKIGALCRQCASSMEALASYVITLQKSQYPEANPELSLKV					
ABR8	SKATEDSLCNFAKWE	PGHGKFGFRHPWSQYQKIGALCRQCASSMEALASYVITLQKSQYPEANPELSLKV					
E66	SKATEDSLCNFAKWE	PGHGKFGFRHPWSQYQKIGALCRQCASSMEALASYVITLQKSQYPEANPELSLKV					
	360	370	380	390	400	410	420
Bd21	RTACSEMSSDSAKALRELSTAIR	TMTVPSPANITMSAAITVAKGLRSELSQDMALLQVMHVAVTATLLSD					
ABR1	RTACSEMSSDSAKALRELSTAIR	TMTVPSPANITMSAAITVAKGLRSELSQDMALLQVMHVAVTATLLSD					
ABR8	RTACSEMSSDSAKALRELSTAIR	TMTVPSPANITMSAAITVAKGLRSELSQDMALLQVMHVAVTATLLSD					
E66	RTACSEMSSDSAKALRELSTAIR	TMTVPSPANITMSAAITVAKGLRSELSQDMALLQVMHVAVTATLLSD					
	430	440	450				
Bd21	LVTTIKKIAESVDN	LARLAHFKTPEKIQKD	VVINIAS				
ABR1	LVTTIKKIAESVDN	LARLAHFKTPEKIQKD	VVINIAS				
ABR8	LVTTIKKIAESVDN	LARLAHFKTPEKIQKD	VVINIAS				
E66	LVTTIKKIAESVDN	LAL	LAHFKTPEKNK	KDVVINIAR			

Figura 32. Hipotética proteína del gen *BdALMT1* de las líneas diploides sensibles Bd21 (referencia), ABR1 y la línea tolerante ABR8, y de la hipotética proteína del gen *BsALMT1* de la línea diploide E66.

Tabla 13. Variabilidad del gen *ALMT1* en la especie *B. distachyon* y *B. stacei*. Se observa la variabilidad del gen *BdALMT1* entre la línea sensible (ABR1) y tolerante (ABR8), además, la variabilidad entre el gen *BdALMT1* (considerando Bd21, ABR1 y ABR8) y el gen *BsALMT1* (E66).

	Variabilidad del gen <i>BdALMT1</i> entre líneas sensibles y tolerantes		Variabilidad entre el gen <i>BdALMT1</i> y el gen <i>BsALMT1</i>	
	Indels	SNPs	Indels	SNPs
Exón 1	0	1	2	23
Exón 2	0	0	0	9
Exón 3	0	0	0	1
Exón 4	0	0	0	6
Exón 5	0	1	0	15
Total	0	2	2	54
Intrón 1	1	1	9	34
Intrón 2	3	0	16	68
Intrón 3	1	0	1	13
Intrón 4	0	0	1	7
Total	5	1	27	122

4.6.2 Caracterización de las regiones “upstream” y “downstream” del gen *BdALMT1*.

Para amplificar la región “upstream” del gen *BdALMT1* se diseñaron más de 10 parejas de cebadores a partir de la secuencia de referencia de la línea Bd21. En la región “upstream” hemos distinguimos dos zonas denominadas A y B, la zona A tiene 1124 pb y está más alejada del trinucleótido ATG (inicio), mientras que la región B es la más próxima al ATG y comprende 1789 pb (Figura 33).

La zona B se amplificó con dos parejas de cebadores (F6-R2 y F6-R1) en la líneas sensibles *Bd* ABR1 y Bd21, y en las líneas tolerante *Bd* ABR8 y *Bh* CB (Figura 34b). La secuencia de estos fragmentos en las líneas *Bd* ABR1 y ABR8 reveló la existencia de 28 SNPs y dos Indels entre ambas líneas. Sin embargo, la comparación de la secuencia de la zona B de *B. stacei* puso de manifiesto la existencia de una gran cantidad de polimorfismos (SNPs e Indel) (ver Anexo 4).

La región A de 1124 pb se amplificó empleando tres parejas de cebadores (F1-R4, F2-R4 y F2-R3) en ambas líneas *Bd* sensibles, ABR1 y Bd21, y en las líneas tolerantes *Bd* ABR8 y *Bh* CB, obteniéndose amplificación en todas las líneas (Figura 34a).

También se llevaron a cabo PCRs para conseguir amplificar fragmentos que contuvieran juntas las zonas A y B. Para ello se utilizaron diferentes combinaciones de cebadores. En la figura 34c, d se muestran las amplificaciones con dos parejas de cebadores (F1-R2 y F5-R1). Estas parejas de cebadores amplificaron un fragmento del tamaño esperado, semejante al de la línea de referencia Bd21, cuando se empleaba ADN genómico de cinco líneas diploides *Bd* sensibles (Bd21, ABR1, Gaz8, ABR7 y ABR2) y una alotetraploide *Bh* sensible (GRA788). Sin embargo, estas parejas de cebadores no dieron lugar a ningún producto de amplificación con el ADN

genómico de la línea tolerante diploide *Bd* ABR8 y de cinco ecotipos tolerantes *Bh* alotetraploides (Castuera, Serradilla, El molar, Aracena y CB). Este resultado sugiere que probablemente existe una inserción de gran tamaño que impida la amplificación en las líneas tolerantes. A los mismos resultados se llega utilizando otras tres parejas de cebadores (F2-R2, F3-R2 y F4-R2) (Figura 33).

Basándonos en la diferencia encontrada entre líneas tolerantes y sensibles en la región “upstream” del gen *BdALMT1*, se procedió a comprobar si esta probable inserción se encontraba presente en todas las líneas tolerantes y ausente en todas las sensibles. Para ello analizamos con una de las parejas de cebadores (F3-R2) 59 líneas diploides *Bd* y 33 líneas *Bh* alotetraploides. Las líneas tolerantes, la diploide *Bd* ABR8 y las 10 alotetraploides *Bh* (M2, M10, M15, Cortegana, Molar, Aracena, Serradilla, CB, Castuera y Hoyo de Pinares), no dieron lugar a producto de amplificación (Figura 34c, d y Figura 35). Las líneas sensibles, las 58 diploides *Bd* y las 23 alotetraploides *Bh*, dieron lugar a un producto de amplificación con el tamaño esperado (Figura 35). Por tanto, existe una asociación significativa entre la tolerancia al estrés por AI y la presencia de la inserción en el promotor de la región “upstream” del gen *BdALMT1*.

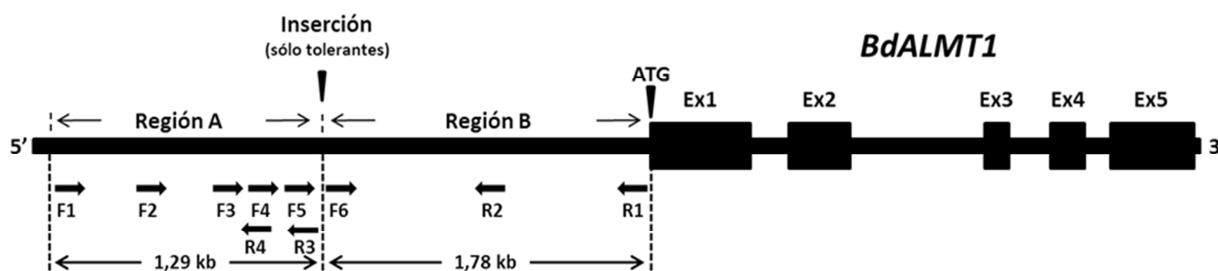


Figura 33. Mapa de la región codificante y región promotora del gen *BdALMT1*. El gen *BdALMT1* tiene cinco exones (Ex1 al Ex5) y cuatro intrones. La región 5' “upstream” se ha subdividido en dos zonas, la zona A y la zona B. La zona A (1290 pb) y la zona B (1789 pb) están presentes en líneas sensibles y tolerantes, diploides y alotetraploides. Se indica el sitio probable de la inserción detectada solamente en líneas tolerantes (*Bd* y *Bh*). (ATG) primer codón de inicio de la traducción. Los distintos cebadores usados para amplificar las diferentes regiones se indican debajo del mapa.

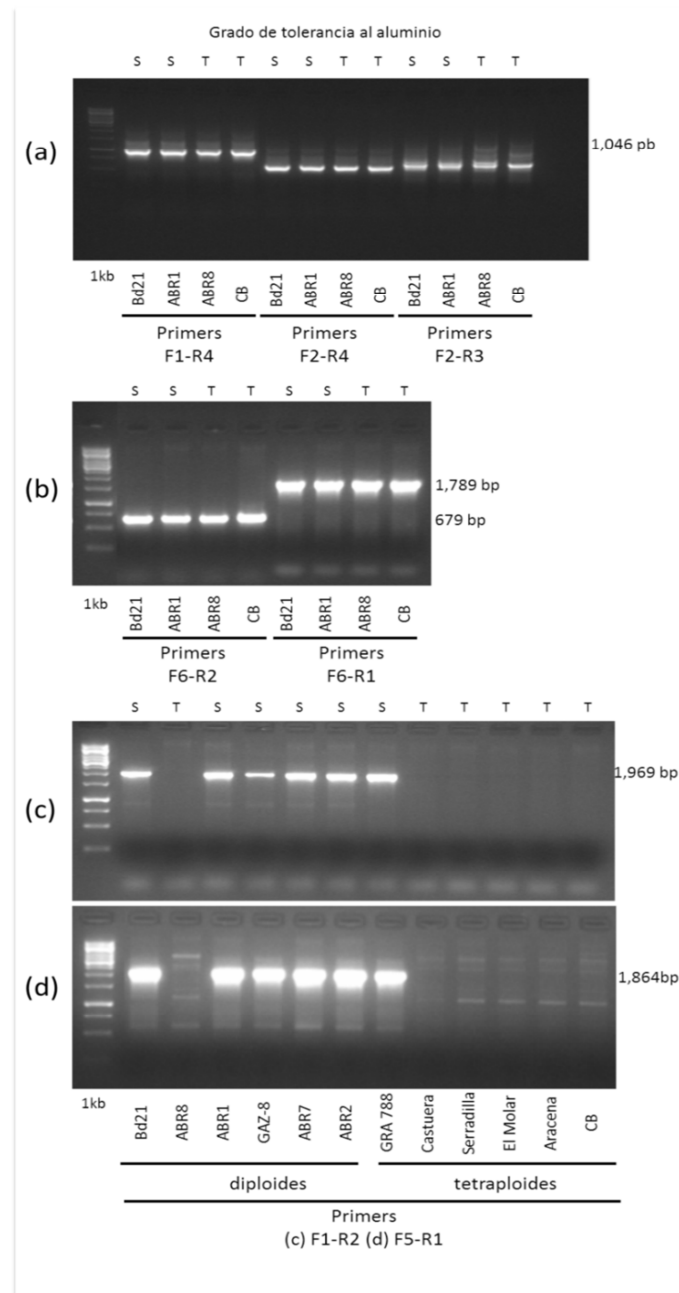


Figura 34. Productos de PCR generados en la región “upstream” del gen *BdALMT1* usando diferentes parejas de “primers”. Los amplicones obtenidos a partir de ADN genómico de genotipos diploides *Bd* y alotetraploides *Bh* sensibles (S) y tolerantes (T). **(a)** Ejemplo de amplicones producidos en la “zona A” de tres líneas diploides (Bd21, ABR1 y ABR8) y una tetraploide (CB) usando tres parejas de cebadores, F1-R4 (1046 pb), F2-R4 (596 pb) y F2-R3 (674 pb). **(b)** Ejemplo de amplicones producidos en la “zona B” de tres líneas diploides (Bd21, ABR1 y ABR8) y una alotetraploide (CB) usando dos parejas de cebadores, F6-R2 (679 pb) y F6-R1 (1789 pb). **(c)** y **(d)** Ejemplo de amplicones obtenidos de seis líneas diploides y seis líneas alotetraploides para detectar la presencia de la inserción (sin amplificación) y la ausencia de la inserción (con amplificación), usando dos parejas de cebadores F1-R2 (1969 pb) **(c)** y F5-R1 (1864 pb) **(d)**. Para más detalles de la localización de los cebadores ver Figura 33.

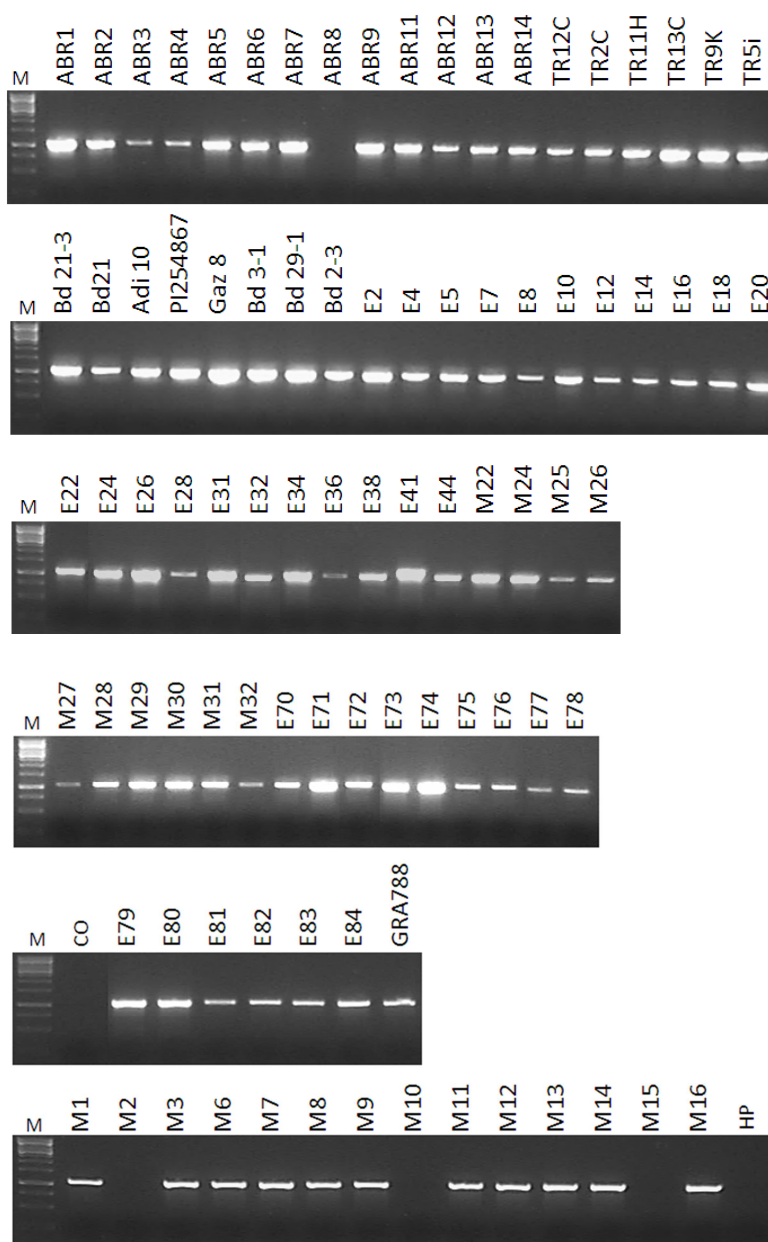


Figura 35. Productos de amplificación generados en la región “upstream” del gen *BdALMT1* en 59 líneas diploides y 32 líneas allotetraploides usando la pareja de cebadores F3-R2. Esta pareja de cebadores fue diseñada para detectar la presencia (sin amplificación) y ausencia (con producto de amplificación) de una probable inserción en la región promotora del gen *BdALMT1*. Los amplicones fueron separados por electroforesis en geles de agarosa y teñidos con bromuro de etidio. La línea tolerante diploide *Bd* ABR8 y los ecotipos tolerantes allotetraploides *Bh* (Cortegana, M2, M10, M15 y Hoyo de Pinares) tienen la inserción (ausencia de amplificación), el resto de las muestras diploides y allotetraploides clasificadas como sensibles no tienen la inserción (presencia de producto de amplificación).



Se obtuvo una parte de la secuencia de la región 3' "downstream" del gen *BdALMT1* (634 pb), en líneas diploides *Bd* y alotetraploides *Bh*, en estas últimas se logró obtener la secuencia sin problemas debido a que la pareja de cebadores estaba diseñada a partir del genoma de *B. distachyon*. Sin embargo, en la línea E66 de *B. stacei* no se obtuvo amplificación ni con esta pareja de cebadores ni con otra más que fue diseñada a tal efecto. Por lo tanto, no disponemos de la secuencia de la región "downstream" en *B. stacei*. En la región situada entre el triplete de terminación (TGA) y 634 pb "aguas abajo" sólo se detectaron ocho SNPs entre líneas diploides *Bd* sensibles (Bd21, ABR1, ABR2 y GAZ8), *Bd* tolerante (ABR8) y los ecotipos tetraploides *Bh* tolerantes (El Molar, CB y Castuera) (ver las secuencias en Anexo 5).

4.6.2.1 Marcadores moleculares que diferencian las especies de *B. distachyon*, *B. stacei* y *B. hybridum*

Con el fin conseguir un marcador molecular que distinguiera *B. distachyon*, *B. stacei* y *B. hybridum* (los tres citotipos diferentes) se diseñaron dos parejas de cebadores en el gen *ALMT1*, cada una de ellas tenía un "primer" en la región 5' ("upstream") y el otro en el exón 1 del gen. El exón 1 de dicho gen en *B. stacei* muestra una delección comparado con el exón 1 del *B. distachyon*. Por tanto, la amplificación con esta pareja de cebadores permite distinguir los tres citotipos. Ambas parejas de cebadores permiten diferenciar los tres citotipos, de forma que las amplificaciones de ADN genómico de *Bd* y *Bs* dan lugar a un solo fragmento de distinto tamaño en cada citotipo y la amplificación del ADN genómico de *Bh* da lugar ambos fragmentos simultáneamente, indicando que esta especie es alotetraploide. En la Figura 36 se observan los patrones de amplificación de los tres citotipos con la pareja de cebadores F850-R856. En la Figura 37 se observa el patrón de amplificación de todas las líneas estudiadas con la pareja de cebadores F855-R856. Además, como veremos más adelante, también hay cinco SSRs (Bd2GSSR_212, Bd4GSSR_399, Bd5GSSR_128, Bd1GSSR_174 y Bd4GSSR_272) que son capaces de distinguir los tres citotipos.

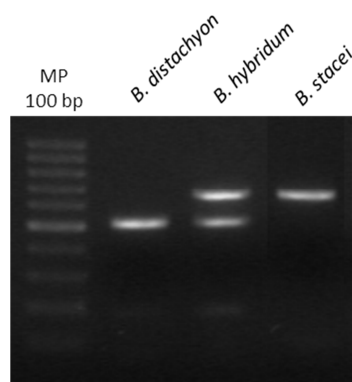


Figura 36. Marcador molecular (F850-R856) que distingue entre los tres citotipos, *B. distachyon* (ABR1), *B. hybridum* (CB) y *B. stacei* (E66). Los fragmentos fueron separados en geles de agarosa al 1,2% y teñidos con bromuro de etidio. (MP) marcador de peso molecular (100 pb).



4.6.3 Caracterización de las regiones “upstream” y “downstream” de los genes *BdMATE1* y *BdMATE2*

Debido a las diferencias de expresión observadas entre las líneas diploides sensible y tolerante en los genes *BdMATE1* y *BdMATE2*, donde la cantidad de transcritos fue mayor en la línea tolerante diploide *Bd* ABR8 que en la sensible *Bd* ABR1 en los tratamientos sin AI, se decidió realizar un estudio de las regiones que flanquean estos genes. Se obtuvieron secuencias de unos 600 pb de las regiones “upstream” y “downstream” de ambos genes en las líneas *Bd* sensible *Bd* ABR1 y tolerante *Bd* ABR8. Las secuencias fueron alineadas mediante el programa ClustalW usando también la secuencia de referencia de la línea *Bd*21 que está clasificada como genotipo sensible al estrés por AI.

La región “upstream” del gen *BdMATE1* no hay diferencias entre ABR1 y ABR8, sin embargo se detectan tres SNPs y dos Indel (uno de 3 pb y otro de 16 pb) al comparar con la secuencia de *Bd*21. En la región downstream también no hay diferencias entre ABR1 y ABR8 y de nuevo se detectaron diferencias al comparar con *Bd*21, tres SNPs y un Indel (de 2 pb) (Anexo 6 y 7).

Al analizar las secuencias que flanquean el gen *BdMATE2*, se observó una mayor variabilidad, se detectaron 12 SNPs y una inserción de un nucleótido entre la línea sensible *Bd* ABR1 y la tolerante *Bd* ABR8. En la región “downstream” se encontraron nueve SNPs y una delección de 18 pb entre ambas líneas *Bd* (ABR1 y ABR8). La comparación en la región “downstream” de las dos líneas *Bd* sensibles (ABR1 y *Bd*21) con la tolerante (ABR8) reveló la existencia de siete SNPs y una delección de 18 pb (Anexos 8 y 9).

5. Variabilidad genética y establecimiento de relaciones filogenéticas mediante el estudio de microsatélites (SSRs) e inter-microsatélites (ISSRs).

Con el objetivo de estudiar la variabilidad genética, establecer relaciones filogenéticas y conseguir marcadores distribuidos uniformemente en los cinco cromosomas de *Brachypodium distachyon*, que en estudios posteriores de ligamiento nos permitieran localizar genes de tolerancia, se decidió poner a punto un sistema de PCR múltiple para analizar simultáneamente, en una sola PCR, varios microsatelites (SSRs). Con la misma finalidad también se estudiaron inter-microsatélites (ISSRs). Los SSR puestos a punto y los ISSR fueron analizados en 52 líneas diploides de *Bd*, 9 líneas diploides de *Bs* y 33 líneas alotetraploides de *Bh*.

4.6.1 Microsatélites (SSRs)

Con el programa Phobos 3.3.1.1 (Mayer 2010) se identificaron en la secuencia de *Bd*21 un total 3009 SSRs pentanucleótidos con un límite mínimo de cuatro repeticiones. En el cromosoma 1 se detectaron 554 SSRs (nº de repeticiones entre 4 a 16), en el cromosoma 2 se detectaron 446 SSRs (nº de repeticiones entre 4 a 13), en el cromosoma 3 hubo 456 SSRs (nº de repeticiones entre 4 a 12), en el cromosoma 4 aparecieron 369 SSRs (nº de repeticiones entre 4 a 20) y en el cromosoma 5 se encontraron 184 SSRs (nº de repeticiones entre 4 a 11). Para obtener

productos amplificados de tamaño pequeño (entre 100 y 450 pb) los SSRs pentanucleótidos con un nº de repeticiones entre 6 y 9 fueron seleccionados. Además, fueron seleccionados distribuidos uniformemente por cada cromosoma. Se probaron diversas combinaciones de 12 SSR diferentes para encontrar parejas de “primers” compatibles usando el programa MPprimer (Zhiyong et al. 2010). Como resultado se obtuvieron dos grupos de PCR múltiple, un grupo con nueve SSRs (Grupo 1) y otro con ocho SSRs (Grupo 2). Tres SSRs estaban en el cromosoma 1, en el cromosoma 2 había cuatro SSRs, en el cromosoma 3 se detectaron tres SSRs, en el cromosoma 4 encontramos tres SSRs y en el cromosoma 5 se localizaron cuatro SSRs (ver Figura 15, en Material y Métodos).

En primer lugar, se realizaron amplificaciones de cada SSR por separado, y se analizaron los resultados en geles de agarosa, para comprobar que se amplificaba en cada caso una sola banda del tamaño esperado. Posteriormente, se hicieron pruebas de los dos grupos de SSR (Grupo Nº1 y Grupo Nº2) en geles de agarosa, para comprobar que se amplificaban en cada PCR múltiple diseñada todas bandas esperadas. Los patrones de amplificación obtenidos para el Grupo Nº 1 y para el Grupo Nº 2 presentaron un número de bandas muy semejante en *Bd* y *Bh* (Figura 38 y 39). Sin embargo, el número de SSR amplificados en *Bs* fue inferior en ambas PCR múltiples.

En el caso del grupo Nº 1 también se incluyeron otras especies como trigo (*Triticum aestivum*) y Caña de azúcar (*Saccharum officinarum*), en esta última especie no se detectó ninguna amplificación consistente, mientras que en trigo si se obtuvieron algunas bandas amplificadas (Figura 38).

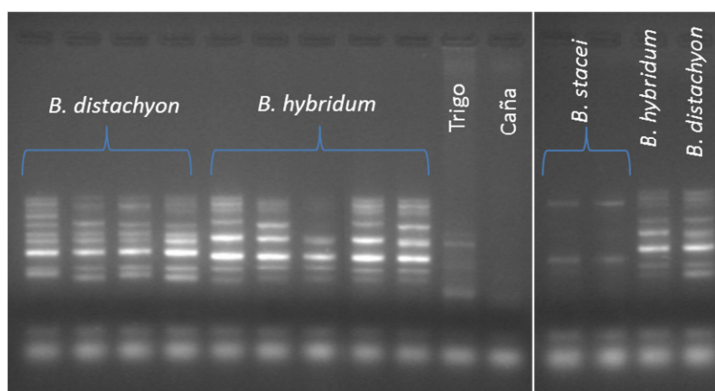


Figura 38. PCR múltiple de SSRs del Grupo Nº1 en gel de agarosa al 2,5% teñido con bromuro de etidio. De izquierda a derecha: cuatro líneas *Bd*, cinco líneas *Bh*, una muestra de trigo y otra de caña de azúcar, dos líneas *Bs* (E66 y M19), una línea *Bh* y otra *Bd*.

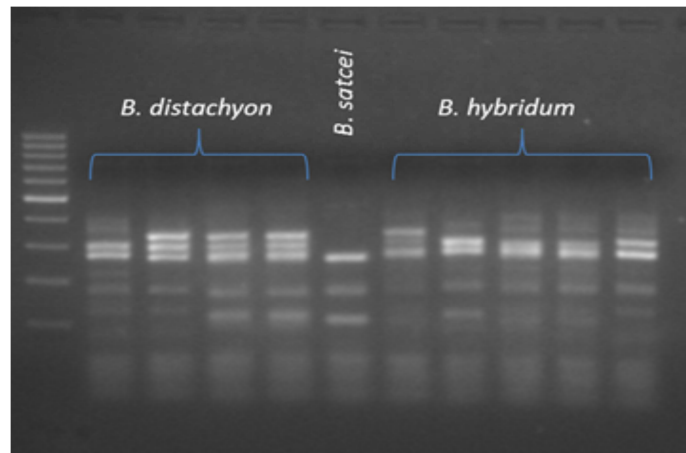


Figura 39. PCR múltiple de SSRs del Grupo N°2 en gel de agarosa al 2,5% teñido con bromuro de etidio. De izquierda a derecha: cuatro líneas *Bd*, una línea *Bs* (E66), y cinco líneas *Bh*. El marcador de peso molecular es de 100 bp (Biotools).

Los análisis de ambas PCR múltiples mediante electroforesis capilar en el equipo de secuenciación se muestran en la Figura 40. El número de picos que se observan en el Grupo N°1 son: nueve en *Bd*, dos en *Bs* y 10 en *Bh* (Figura 40a). Estos resultados coinciden bien con lo observado en agarosa (Figura 38) y con lo esperado. El número de picos obtenidos en el Grupo N° 2 son: ocho en *Bd*, cuatro en *Bs* y 12 en *Bh* (Figura 40b). De nuevo el resultado concuerda con lo observado en agarosa (Figura 39) y con lo esperado.

Todas las líneas diploides de *Bd* mostraron un solo pico en el electroforegrama en cada uno de los 17 microsatélites estudiados (Anexo 10). Solamente algunas líneas alotetraploides de *Bh* presentaron dos picos en los electroforegramas para algunos SSRs. Todas las líneas de *B. stacei* analizadas fueron idénticas y mostraron los mismos alelos, aunque solamente se obtuvieron amplificaciones claras con cinco de los 17 SSRs estudiados (Bd2GSSR_212, Bd4GSSR_399, Bd5GSSR_128, Bd1GSSR_174 y Bd4GSSR_272) (Figura 40).

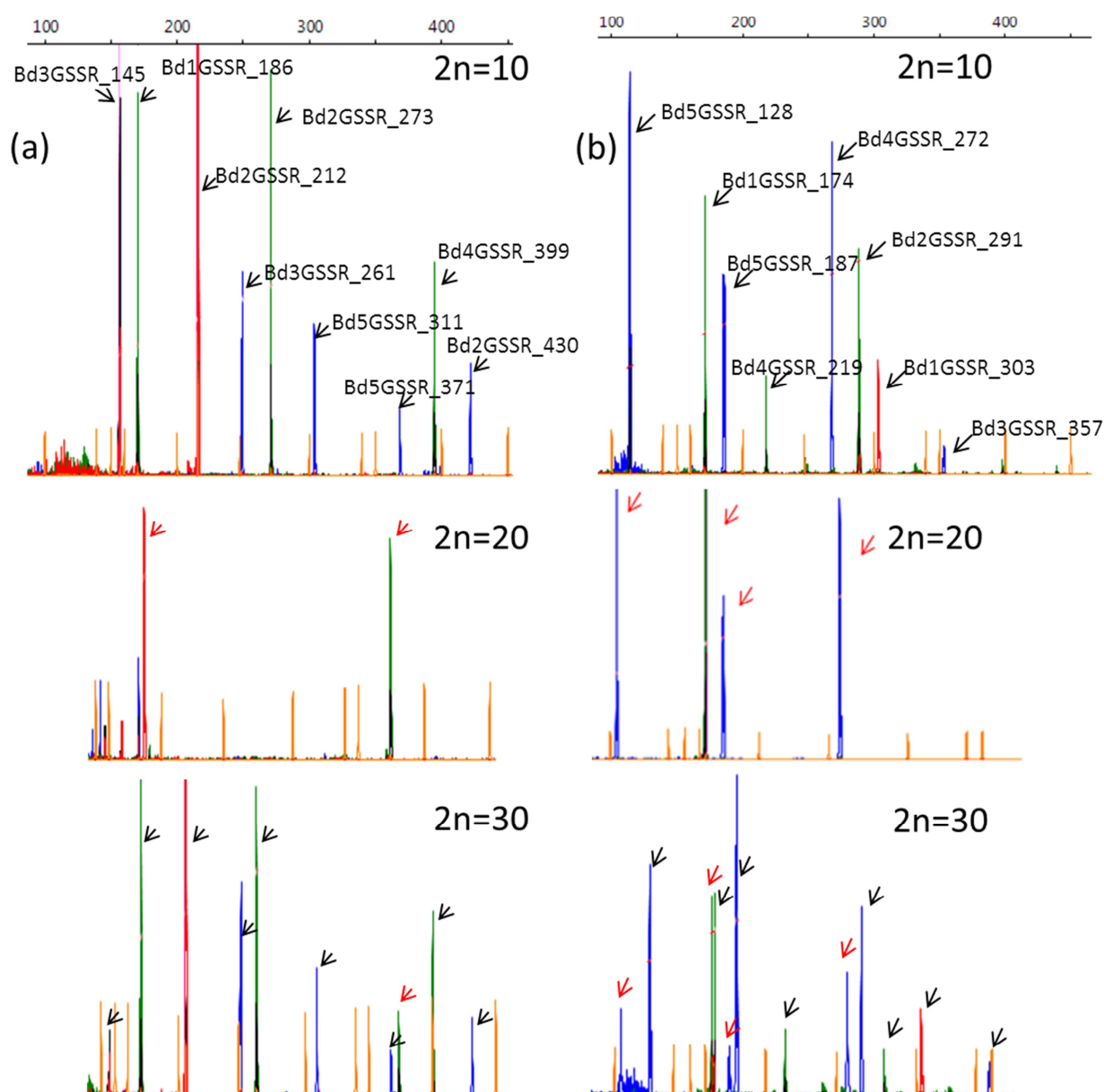


Figura 40. Electroferograma de dos grupos de PCR múltiples. Ejemplo de patrones observados con el Grupo N°1 de SSR en las líneas diploides Bd21 (*Bd*; $2n=10$) y E66 (*Bs*; $2n=20$) y en la línea la alotetraploide E78 (*Bh*; $2n=30$); en *Bd* se observan los nueve picos esperados, en *Bs* dos picos y en *Bh* 10 picos. Las flechas de color negro indican los picos de *Bd* y las flechas en rojo indican los picos de *Bs* (a). Ejemplo de patrones observados con el Grupo N°2 de SSR en las líneas diploides ABR1 (*Bd*; $2n=10$) y E66 (*Bs*; $2n=20$) y en la línea la tetraploide M16 (*Bh*; $2n=30$); en *Bd* se observan los ocho picos esperados, en *Bs* cuatro picos y en *Bh* 12 picos. Las flechas de color negro indican los picos de *Bd* y las flechas en rojo indican los picos de *Bs* (b).



El número total de alelos diferentes detectados en las líneas de *Brachypodium distachyon* fue de 55 alelos y en *Brachypodium hybridum* de 54, de estos 54 alelos cinco procedían del genoma de *Brachypodium stacei* (Anexo 10). El microsatélite Bd5GSSR_371 mostró el mismo alelo en todas las líneas de *Bd* y *Bh*, siendo este SSR no variable (uniforme). En *Bd* se encontraron cuatro alelos exclusivos de la línea tolerante ABR8 y en *Bh* se detectaron 12 alelos exclusivos de los ecotipos tolerantes, siete de estos 12 alelos estaban presentes en las 10 líneas tolerantes de *Bh*, es decir, tenían frecuencia 1. Los cuatro alelos exclusivos de la línea tolerante *Bd* ABR8 se encuentran en los cromosomas Cr1, Cr3 y Cr5, y los 12 en las líneas *Bh* tetraploides tolerantes están repartidos en los cinco cromosomas (Tabla 14).

Tabla 14: Número y tamaño de los alelos de cada marcador SSR de 52 líneas diploides y 33 líneas alotetraploides. Se observan los alelos exclusivos de la línea tolerante ABR8 y los alelos exclusivos de las líneas tolerantes alotetraploides, los alelos indicados en negrita y subrayado son aquellos detectados en las 10 líneas tolerantes (frecuencia 1). Además, se indican los alelos propios del genoma de *Bs* detectados en *Bh*.

Nombre SSR	Nº de alelos y tamaños en <i>Brachypodium distachyon</i>	Alelos exclusivos de la tolerante (ABR8)	Nº de alelos y tamaños en <i>Brachypodium hybridum</i> (<i>Bh</i>)	Alelos exclusivos de las tolerantes (<i>Bh</i>)	Alelos de <i>Brachypodium stacei</i> presentes en <i>Bh</i>
Bd3GSSR_145	4 (140,145, 150,155)	1 (140)	4 (135, 140, 145, 155)	2 (<u>135</u> , 155)	
Bd1GSSR_186	6 (160,165,170,175, 180,185)	1 (160)	3 (170, 175, 185)		
Bd2GSSR_212	2 (210,215)		4 (195, 205,210, 215)	1 (195)	
Bd2GSSR_212 (B)			1 (185)		186
Bd3GSSR_261	3 (245, 250,260)		2 (250, 260)		
Bd2GSSR_273	4 (260, 265,270,280)		2 (260, 265)		
Bd5GSSR_311	3 (304, 309, 319)	1 (319)	3 (304, 309, 319)		
Bd5GSSR_371	1 (369)		1 (369)		
Bd4GSSR_399	4 (384,389,394,399)		3 (384, 394, 399)	1 (<u>384</u>)	
Bd4GSSR_399 (B)			1 (374)		374
Bd2GSSR_430	4 (421, 426, 431, 436)		4 (421, 431, 436, 446)	1 (<u>446</u>)	
Bd5GSSR_128	2 (113, 123)		2 (113, 123)	1 (<u>113</u>)	
Bd5GSSR_128 (B)			1 (104)		104
Bd1GSSR_174	3 (160, 165, 170)		2 (164, 165)	1 (<u>164</u>)	
Bd1GSSR_174 (B)			1 (164)		164
Bd5GSSR_187	3 (175, 180, 185)		3 (180, 185, 190)	1 (190)	
Bd4GSSR_219	2 (212, 217)		3 (192, 212, 217)	1 (<u>192</u>)	
Bd4GSSR_272	2 (263, 268)		2 (263, 268)		
Bd4GSSR_272 (B)			1 (253)		254
Bd2GSSR_291	3 (278, 288, 293)		3 (278, 283, 288)	1 (283)	
Bd1GSSR_303	3 (298, 303, 308)		3 (293, 298, 303)	1 (<u>298</u>)	
Bd3GSSR_357	6 (332, 342, 347, 352, 357, 362)	1 (332)	5 (327, 332, 342, 347, 352)	1 (327)	

En las 52 líneas diploides de *Bd* el PIC, con 16 marcadores SSR pentanucleótidos, varió entre 0,14 (Bd4GSSR_219) y 0,70 (Bd4GSSR_399) y la media fue de 0,42. En las 33 líneas alotetraploides de *Bh* el PIC con los mismos 16 SSRs osciló entre 0,26 (Bd4GSSR272) y 0,80 (Bd4GSSR219) y el promedio fue de 0,5. El número medio de alelos en las líneas diploides *Bd* fue 3,4 y en las líneas alotetraploides *Bh* fue 3 (Tabla 15). El número medio de alelos en las líneas alotetraploides tolerantes (1,4) fue menor que el encontrado en las alotetraploides sensibles (2,3); observándose una situación semejante con el PIC promedio, que fue de 0,10 en las tolerantes y 0,30 en las sensibles (Tabla 15). Para los cálculos de variabilidad en todas las líneas no se consideró el marcador Bd5GSSR_371 por ser uniforme (no variable).

Tabla 15. Número de alelos y contenido informativo del polimorfismo (PIC) de 16 marcadores SSR, procedentes de 52 líneas diploides (*Bd*) y 33 líneas alotetraploides (*Bh*). Las alotetraploides se separaron en tolerantes (10 líneas) y sensibles (23 líneas).

SSR	Diploides (<i>Bd</i>) Total		Alotetraploides Total		Alotetraploides Tolerantes		Alotetraploides Sensibles	
	Nº alelos	PIC	Nº alelos	PIC	Nº alelos	PIC	Nº alelos	PIC
Bd3GSSR_145	4	0,18	4	0,39	3	0,54	2	0,08
Bd1GSSR_186	6	0,66	3	0,31	1	0	3	0,40
Bd2GSSR_212	2	0,17	4	0,44	2	0,48	3	0,23
Bd3GSSR_261	3	0,54	2	0,50	1	0	2	0,45
Bd2GSSR_273	4	0,48	2	0,50	1	0	2	0,42
Bd5GSSR_311	3	0,42	3	0,61	1	0	3	0,61
Bd4GSSR_399	4	0,70	3	0,46	1	0	2	0,08
Bd2GSSR_430	4	0,57	4	0,57	1	0	3	0,30
Bd5GSSR_128	2	0,20	2	0,42	1	0	1	0,00
Bd1GSSR_174	3	0,57	2	0,42	1	0	1	0,00
Bd5GSSR_187	3	0,46	3	0,54	3	0,46	2	0,50
Bd4GSSR_219	2	0,14	3	0,80	1	0	2	0,50
Bd4GSSR_272	2	0,47	2	0,26	1	0	2	0,34
Bd2GSSR_291	3	0,27	3	0,54	2	0,18	2	0,23
Bd1GSSR_303	3	0,18	3	0,46	1	0	2	0,08
Bd3GSSR_357	6	0,66	5	0,71	1	0	4	0,60
PROMEDIO	3,4	0,42	3	0,5	1,4	0,10	2,3	0,30

Los análisis filogenéticos con SSRs se llevaron a cabo utilizando la distancia standard de Nei (1973), la distancia de cuerda de Cavalli-Sforza (Chakraborty y Jin, 1993), dos métodos de agrupamiento, UPGMA y Neighbour-Joining (NJ) y un valor de “bootstrap” de 10000. Por tanto, se obtuvieron cuatro dendrogramas, todos ellos con una estructura muy semejante, con los mismos agrupamientos o clusters.

El dendrograma obtenido con la distancia de Cavalli-Sforza y Neighbour-Joining se ha representado en la Figura 41. Las líneas diploides de *Bd* se encuentran en “clusters” distintos a las líneas alotetraploides de *Bh*. La línea diploide *Bd* ABR8 tolerante queda separada del resto de las líneas diploides *Bd* sensibles. Las líneas diploides *Bd* sensibles procedentes de España se encuentran en subgrupos distintos a las líneas diploides *Bd* sensibles de Turquía e Iraq. Las diez líneas tolerantes de *Bh* se encuentran en un grupo (“cluster”) diferente al resto de líneas alotetraploides *Bh* sensibles. Los valores de “bootstrap” de los agrupamientos más importantes fueron bastante elevados.

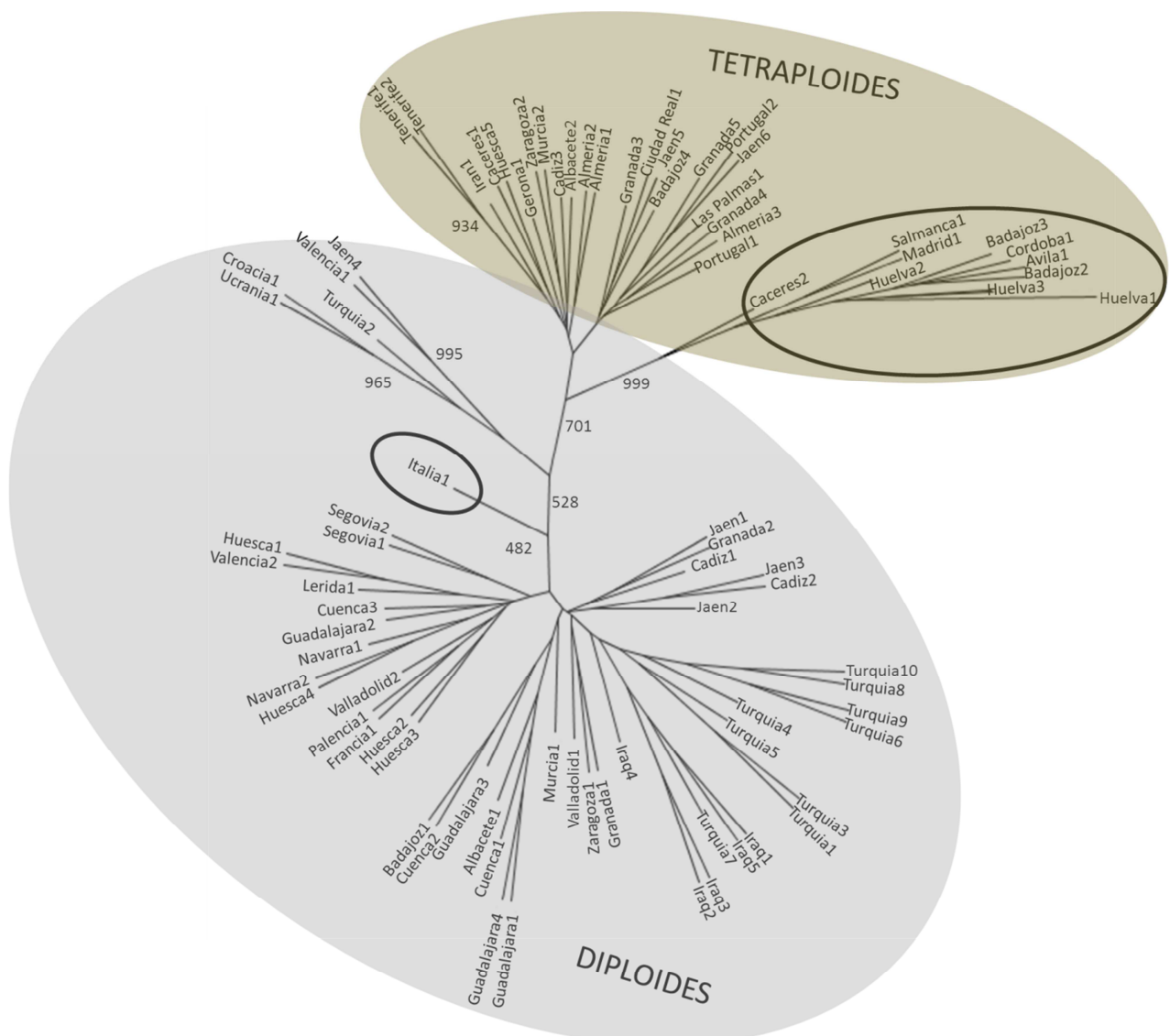


Figura 41. Dendrograma con SSRs elaborado con el método de agrupamiento Neighbour-Joining, la distancia de Cavalli-Sforza y un “bootstrap” de 10000, para 52 líneas diploides (*Bd*) y 33 líneas alotetraploides (*Bh*). Las líneas rodeadas por una elipse negra son líneas tolerantes, el resto son sensibles. En todos los casos se ha indicado el lugar de procedencia, el nombre original de las líneas se puede encontrar en la Tabla 2 de Material y Métodos.

5.2. Inter-microsatélites (ISSRs)

Además, de los SSRs pentanucleotidos también se analizaron inter-microsatélites (ISSRs) para estudiar la variabilidad y establecer relaciones filogenéticas. Con siete cebadores ISSR (811, 834, 835, 842, 844, 846 y 855) se amplificaron 116 bandas diferentes en las 52 líneas diploides (*Bd*) y 139 bandas en las 33 líneas alotetraploides (*Bh*). El tamaño de los fragmentos amplificados osciló entre 150 y 2000 pb. En la Figura 42 se pueden observar los productos de amplificación obtenidos con el cebador ISSR 844 en las 52 líneas diploides *Bd* y los observados en las 33 líneas alotetraploides *Bh*. Los productos de amplificación (Anexo 11) y las lecturas de presencia o ausencia de cada banda en las 52 líneas diploides *Bd* y 33 alotetraploides *Bh* están en el Anexo 12.

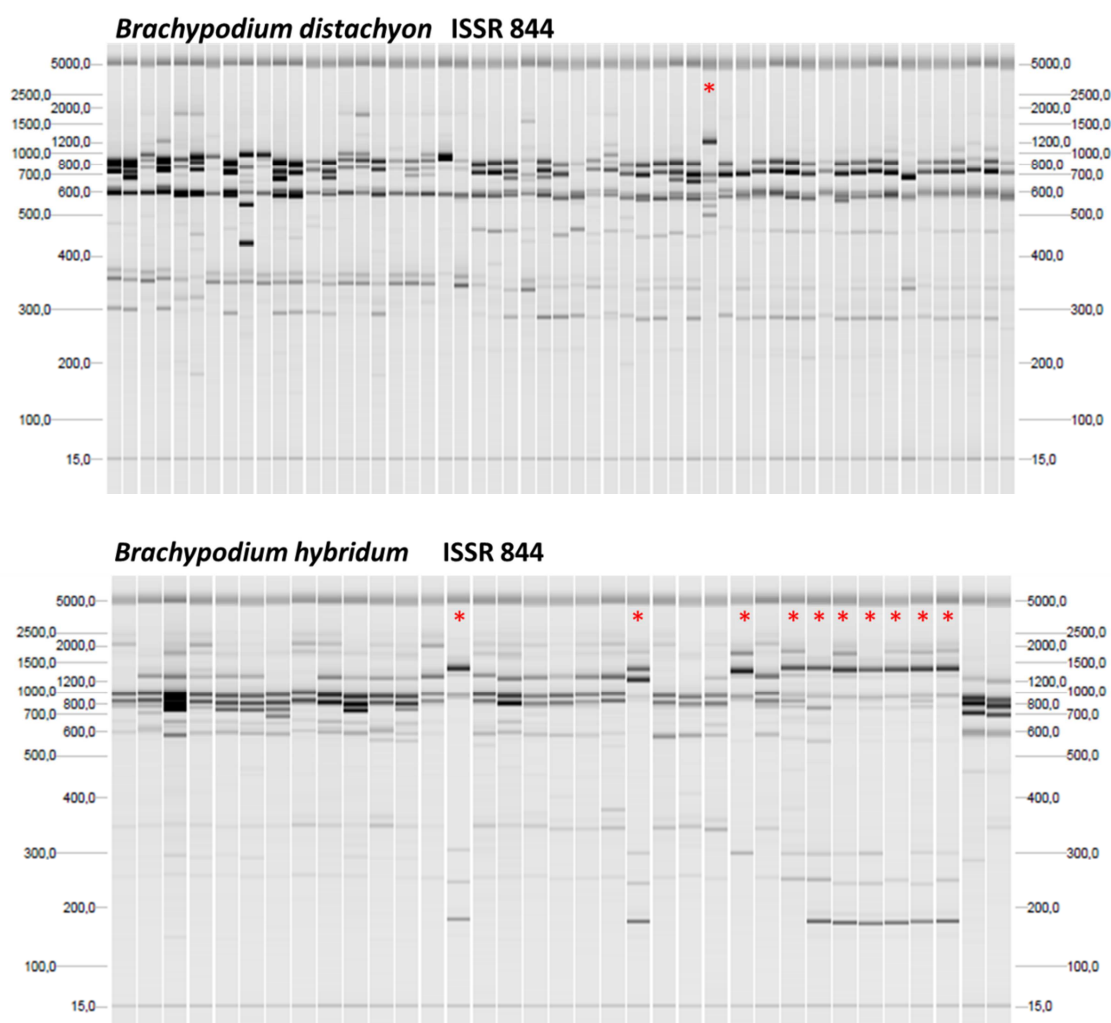


Figura 42. Perfiles de amplificación obtenidos con el cebador ISSR 844 y el equipo de electroforesis capilar QiaExcel en las 52 líneas diploides *Bd* (parte superior) y de las 33 líneas alotetraploides *Bh* (parte inferior). Las líneas tolerantes se han señalado con un asterisco rojo, la línea *Bd* ABR8 y las 10 líneas *Bh* (de izquierda a derecha M2, M10, M15, Castuera, Cortegana, CB, Molar, Serradilla, Aracena y Hoyo de Pinares).



En la Tabla 16 se indica, para cada cebador ISSR, el número total de bandas (NTB), el número de bandas polimórficas (NBP) a 95% y 99%, el porcentaje de bandas polimórficas al 99% (P%), el número de genotipos diferentes (NG), el poder de resolución (Rp) y el número de bandas exclusivas (NBE). El número total de bandas (productos amplificados) obtenidas en *Bd* fue de 116 y en *Bh* fue de 139. El número medio de bandas amplificadas por cebador en las líneas *Bd* y *Bh* fue de 16,6 y 19,6 bandas, respectivamente. El máximo número de productos amplificados (NTB) en *Bd* se obtuvo con el cebador 842 (22 bandas) y el mínimo con el cebador 855 (11 bandas), en *Bh* el máximo NTB se detectó con los cebadores 835 y 842 (22 bandas) y el mínimo con el cebador 811 (14 bandas) (Tabla 16). El poder de resolución (Rp) en las líneas *Bd* osciló entre 2,1 (cebador 846) y 7,9 (cebador 834), y en líneas *Bh* entre 7,8 (cebador 855) y 11,2 (cebador 842). El cebador 811 pudo distinguir 46 genotipos (NG) diferentes en las líneas *Bd*, y los cebadores 835 y 855 distinguieron 32 genotipos (NG) diferentes en las líneas *Bh*. El número de bandas exclusivas (NBE) observadas en todas las líneas *Bd* y ausentes en todas las líneas *Bh* (NBE) fue de 13, mientras el NBE presentes en todas las líneas *Bh* y ausente en todas las líneas *Bd* fue de 12.

Tabla 16: Número de bandas (NTB), número de bandas polimórficas (NBP) al 95 y 99%, porcentaje de bandas polimórficas al 99% (P %), número de genotipos diferentes (NG), poder de resolución (Rp) y número de bandas exclusivas (NBE) obtenidos con cada cebador ISSR.

Líneas diploides de <i>Brachypodium distachyon</i> (2n=2x=10)								
Cebador	Secuencia	NTB	NBP (95%)	NBP (99%)	P % (99%)	NG	Rp	NBE
811	(GA) ₈ C	21	20	20	95.2	46	7.3	0
834	(AG) ₈ YT	17	15	17	100	34	7.9	2
835	(AG) ₈ YC	15	13	13	86.7	40	5.4	1
842	(GA) ₈ YG	22	21	21	95.4	44	6.9	1
844	(CT) ₈ RC	15	14	14	93.3	30	4.1	3
846	(CA) ₈ RT	15	11	12	80	13	2.1	4
855	(AC) ₈ AYT	11	9	11	100	22	3.1	2
Total		116	103	108	93.1	229	37	13

Líneas alotetraploides de <i>Brachypodium hybridum</i> (2n=4x=30)								
Cebador	Secuencia	NTB	NBP (95%)	NBP (99%)	P (99%)	NG	Rp	NBE
811	(GA) ₈ C	14	14	14	100	28	9.1	0
834	(AG) ₈ YT	21	21	21	100	29	10	1
835	(AG) ₈ YC	22	22	22	95.6	32	9.8	1
842	(GA) ₈ YG	22	22	22	100	28	11.2	3
844	(CT) ₈ RC	20	20	20	100	31	10.1	2
846	(CA) ₈ RT	18	18	19	100	26	8.4	2
855	(AC) ₈ AYT	17	17	19	95.6	32	7.8	3
Total		139	134	137	98.6	206	66.5	12

Un dato que no sale reflejado en la tabla pero que se puede analizar de la matriz de datos de los ISSR, es la presencia de bandas exclusivas (NBE) sólo en líneas tolerantes. Se contabilizaron 11 bandas exclusivas en la línea tolerante *Bd* ABR8 que estaban ausentes en las 51 líneas sensibles *Bd*. También, algunas líneas sensibles tienen una banda exclusiva no encontrada en la tolerante ABR8, estas son Palencia1 y Albacete1. En las líneas *Bh* se contabilizaron siete bandas exclusivas de las líneas tolerantes (10 alotetraploides) y ausentes en las 23 líneas sensibles restantes. También hay tres bandas exclusivas en todas las líneas sensibles *Bh* que están ausentes en las líneas *Bh* tolerantes.

El PIC obtenido con cada “primer” de ISSR en las líneas diploides *Bd* osciló entre 0,31 (primer 834) y 0,11 (primer 846), el PIC promedio obtenido con los siete “primers” de ISSRs fue 0,23 (Tabla 17). En el caso de las líneas alotetraploides de *Bh*, el PIC con cada “primer” de ISSR varió entre 0,43 (primer 811) y 0,27 (primer 855), siendo el PIC promedio con los siete “primers” de ISSR de 0,33. Los valores de PIC promedio de las líneas alotetraploides de *Bh* tolerantes y sensibles fueron 0,16 y 0,24, respectivamente (Tabla 17).

Tabla 17: Contenido informativo del polimorfismo (PIC) de siete cebadores ISSR procedentes de 52 líneas diploides (*Bd*) y 33 líneas alotetraploides (*Bh*). Las alotetraploides se separaron en tolerantes (10 líneas) y sensibles (23 líneas).

Cebador	PIC			
	Diploides Total	Alotetraploides Total	Alotetraploides Tolerantes	Alotetraploides Sensibles
811	0,26	0,43	0,21	0,34
834	0,31	0,32	0,11	0,27
835	0,26	0,29	0,19	0,25
842	0,25	0,34	0,15	0,17
844	0,22	0,34	0,20	0,25
846	0,11	0,30	0,15	0,17
855	0,20	0,27	0,11	0,19
Promedio	0,23	0,33	0,16	0,24

También se llevaron a cabo análisis de las relaciones filogenéticas empleando ISSRs. Con los programas NTSYS y WinBoot, empleando tres índices de similitud diferentes (SM, DICE y Jaccard), el método de agrupamiento UPGMA y un “bootstarp” de 10000 se obtuvieron tres dendrogramas que mostraron una estructura muy semejante, con los mismos agrupamientos.

En la Figura 43 se observa el dendrograma obtenido con el índice de similitud SM y el método de agrupamiento UPGMA. Se pueden ver dos grandes grupos bien definidos con un “bootstrap” alto, el grupo de las 33 líneas alotetraploides (*Bh*) y el grupo de las 52 líneas diploides (*Bd*). La única línea tolerante diploide *Bd* ABR8 (Italia1) disponible se separa claramente del resto de las 51 líneas sensibles y las 10 líneas alotetraploides *Bh* (Huelva1, Salamanca1, Cordoba1, Cáceres2, Madrid1, Huelva2, Avila1, Huelva3, Badajoz3 y Badajoz2) clasificadas como tolerantes se separan también con un “bootstrap” alto de las 23 líneas sensibles *Bh*. Dentro de

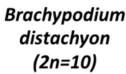


las líneas sensibles diploides *Bd* también se distinguen subgrupos formados por líneas de Turquía e Iraq, y otros subgrupos de líneas españolas, uno de ellos incluye una línea de Francia y otro subgrupo formado por líneas de Ucrania y Croacia que a su vez también incluye a individuos de España.

También se ha obtenido un dendrograma utilizando distancias de restricción y el método de agrupamiento de Neighbour-Joining que muestran una estructura muy semejante a la del dendrograma anterior con los mismos agrupamientos principales (ver Anexo 13).

Un tercer dendrograma se obtuvo mediante Parsimonia con los programas BLMARKER y DOLLOP polymorphism recomendados para marcadores moleculares de herencia dominante como RAPDs, AFLPs e ISSRs (Figura 44). De nuevo, se observó una clara separación de las líneas alotetraploides *Bh* y diploides *Bd*, y de las líneas sensibles y tolerantes coincidiendo con lo observado en los dendrogramas anteriores. La línea diploide *Bd* ABR8 (Italia1) se separa de las demás líneas sensibles *Bd* y, las 10 líneas alotetraploides tolerantes se separan del resto de las sensibles *Bh* (Figura 44).

Por tanto, independientemente del tipo de marcador utilizado (SSRs o ISSRs) para establecer las relaciones filogenéticas, independientemente del tipo de agrupamiento (UPGMA, Neighbour-Joining, Parsimonia) o de distancia genética (Nei o Cavalli-Sforza) o índice de similitud empleado (SM, DICE, Jaccard), siempre se separan las líneas diploides *Bd* de las alotetraploides *Bh* y las líneas sensibles de las tolerantes.



***Brachypodium
hybridum***
 $2n=30$

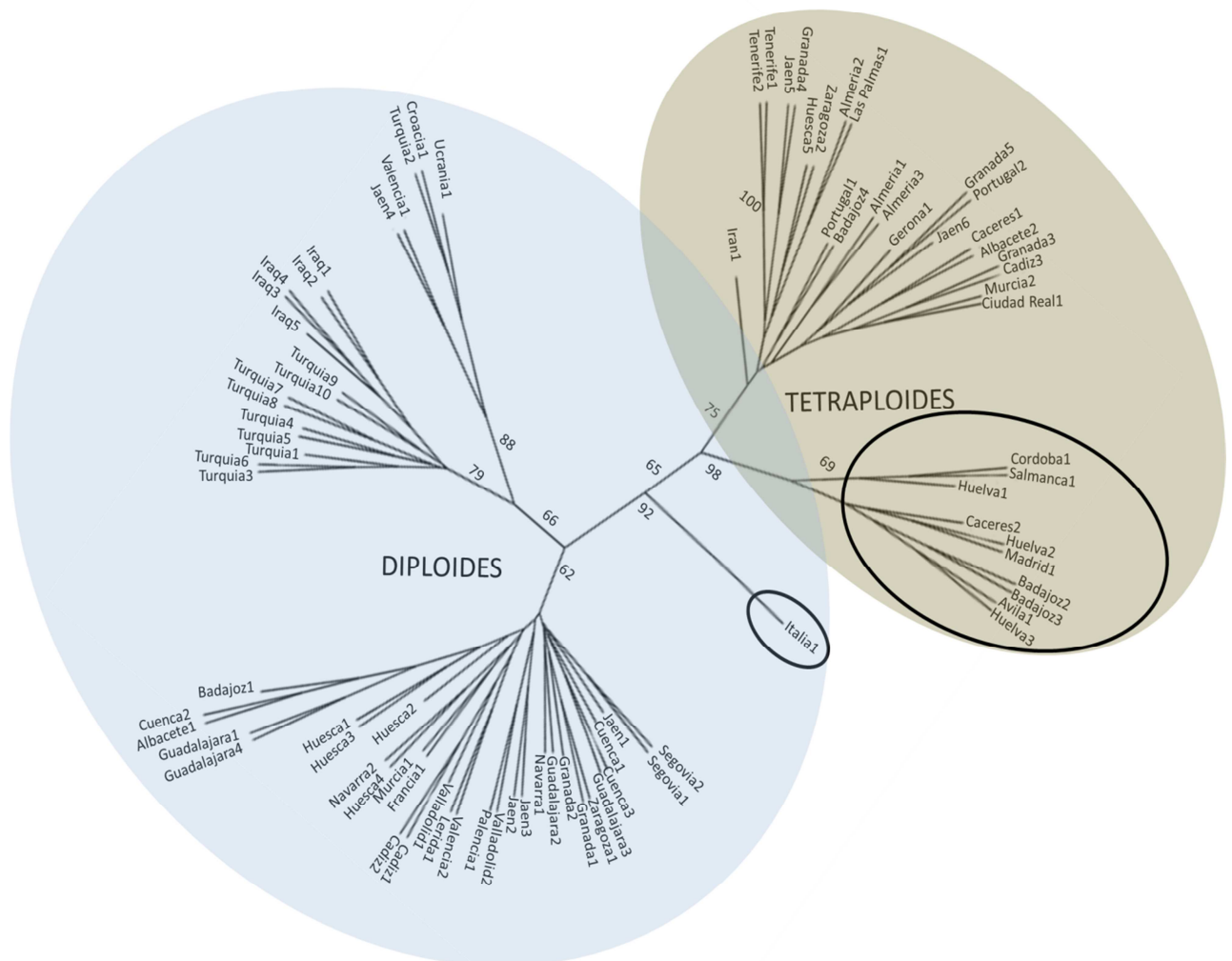


Figura 44. Dendrograma elaborado con ISSRs inferido mediante Parsimonia y “bootstrap” 10000 para 52 líneas diploides (*Bd*) y 33 líneas alotetraploides (*Bh*). Las líneas por una elipse negra son tolerantes, el resto son sensibles. Se indican los valores de “bootstrap”. En todos los casos se ha indicado el lugar de procedencia, el nombre original de las líneas se puede encontrar en la Tabla 2.



6. Determinación del número cromosómico de la muestra diploide tolerante ABR8 y las muestras allotetraploides tolerantes.

La mayoría de las líneas y ecotipos utilizados en este trabajo proceden de centros de germoplasma o de universidades nacionales o extranjeras que previamente habían identificado el número de cromosomas de las muestras. Sin embargo, los ecotipos obtenidos por el Profesor Miguel A. Casado de la UCM no habían sido analizados. Por tal motivo, se llevó a cabo la identificación del número de cromosomas de dichas muestras. Además, debido a que las líneas tolerantes aparecen en los dendrogramas en diferentes grupos o “clusters” que las sensibles, se procedió a corroborar su número cromosómico.

Por otro lado, existen especies del género *Brachypodium*, que se encuentran en España, con números cromosómicos semejantes al de *Bh* ($2n=2x=30$) y con más cromosomas, entre otras especies están *B. boissieri* ($2n=8x=42,46$), *B. phoenicoides* ($2n=4x=28$), *B. retusum* ($2n=4x=36$) y *B. rupestre* ($2n=4x=28$). Igualmente, aunque Jenkins (2013) clasificó como diploide *Bd* ($2n=2x=10$) a la línea tolerante ABR8 procedente de Siena (Italia), y teniendo en cuenta que existen otras especies diploides como *B. glaucovirens* ($2n=2x=16$) y *B. rupestre* ($2n=2x=18$) en Grecia, y *B. pinnatum* ($2n=2x=18$) en Noruega, decidimos volver a comprobar que la línea ABR8 tenía $2n=2x=10$ cromosomas.

A partir de meristemos de raíz se hicieron varias preparaciones para conseguir observar metafases en distintos individuos de *Bd* y *Bh* tolerantes como se muestra en la Figura 45. La línea ABR8 mostró tener 10 cromosomas coincidiendo con la clasificación previa de Jenkins (2013), por lo que se trata de una línea de la especie *Brachypodium distachyon*. Los restantes genotipos tolerantes mostraron tener 30 cromosomas (Costuera, Hoyo de Pinares, El Molar, Aracena y CB) siendo líneas pertenecientes a la especie *Brachypodium hybridum*.

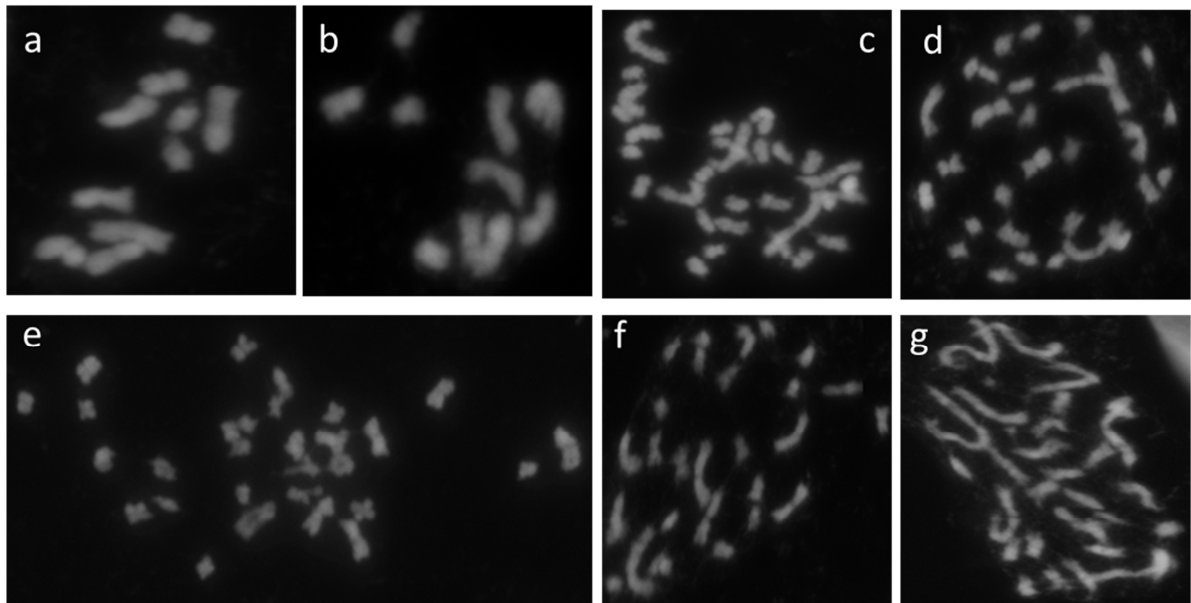


Figura 45. Metafasas mitóticas de la línea tolerante ABR8 (a,b) y de cinco ecotipos alotetraploides tolerantes, Costuera (c), Hoyo de Pinares (d), El Molar (e), Aracena (f) y CB (g). En las alotetraploides se distinguen distintos tamaños de cromosomas, los más grandes proceden de *Bd* y los más pequeños de *Bs*. En el apartado 2.4.2 de Material y Métodos se puede observar la elaboración de las preparaciones citológicas.

7. Relación entre la procedencia de suelos ácidos y la tolerancia al estrés por Al de las líneas de *B. distachyon*, *B. stacei* y *B. hybridum*.

La adaptación de las especies a un determinado ambiente produce cambios fenotípicos y aparición de mecanismos para adaptarse a ambientes hostiles. Una de las interrogantes interesantes relacionadas con el estrés por Al, es saber si las líneas, ecotipos o variedades tolerantes proceden de suelos ácidos y son, por tanto, el resultado de la adaptación a este tipo de terrenos. La mayoría de los trigos hexaploides tolerantes proceden de suelos ácidos de Brasil y Portugal. En la Figura 46 se observa un mapa de España (incluidas las Islas Canarias y Baleares) y de Portugal en el que se han indicado las provincias con predominancia de suelos ácidos. Igualmente, en este mapa se ha indicado, de acuerdo con la localización georeferencial, la provincia y posición de recolección de las líneas empleadas en este trabajo. Los datos de la localización geográfica de las muestras se cruzaron con la información del pH de los suelos en cada provincia facilitados por el INIA (López y Grau 2004). Con esta información se elaboró un mapa de la península con los niveles de pH por provincia, destacando en gris oscuro los niveles de pH de suelo por debajo de 7,0 y destacando en blanco los niveles de pH de suelo por encima de 7,0 (ver detalle de suelos en Anexo 14). En el caso de las Islas Canarias y Baleares el pH predominante de los suelos es alcalino (Fernández y col. 1978, Rita y Rossello 1989). De las 33 muestras alotetraploides *Bh*, según la clasificación obtenida, 10 son tolerantes al estrés por

aluminio, encontrándose repartidas solamente en la parte este de la Península Ibérica, donde predominan los suelos ácidos y ninguna de las muestras tolerantes procede de la parte este, donde predominan los suelos alcalinos. Si se contabilizara los ecotipos por provincias de suelos ácidos, prácticamente el 90% de los ecotipos *Bh* tolerantes se encuentra en provincias de suelos ácidos. Además, las diez muestras *Bh* tolerantes proceden de suelos realmente ácidos (pH bajo) de acuerdo a la tabla de pH de suelos de la provincia correspondiente (ver Anexo Nº 14). La única línea diploide *Bd* tolerante, la línea ABR8, procede de una región de Italia de suelos ácidos, la región de Siena. La inmensa mayoría de las líneas sensibles de *Bd*, *Bs* y *Bh* proceden de suelos con pH alcalino.

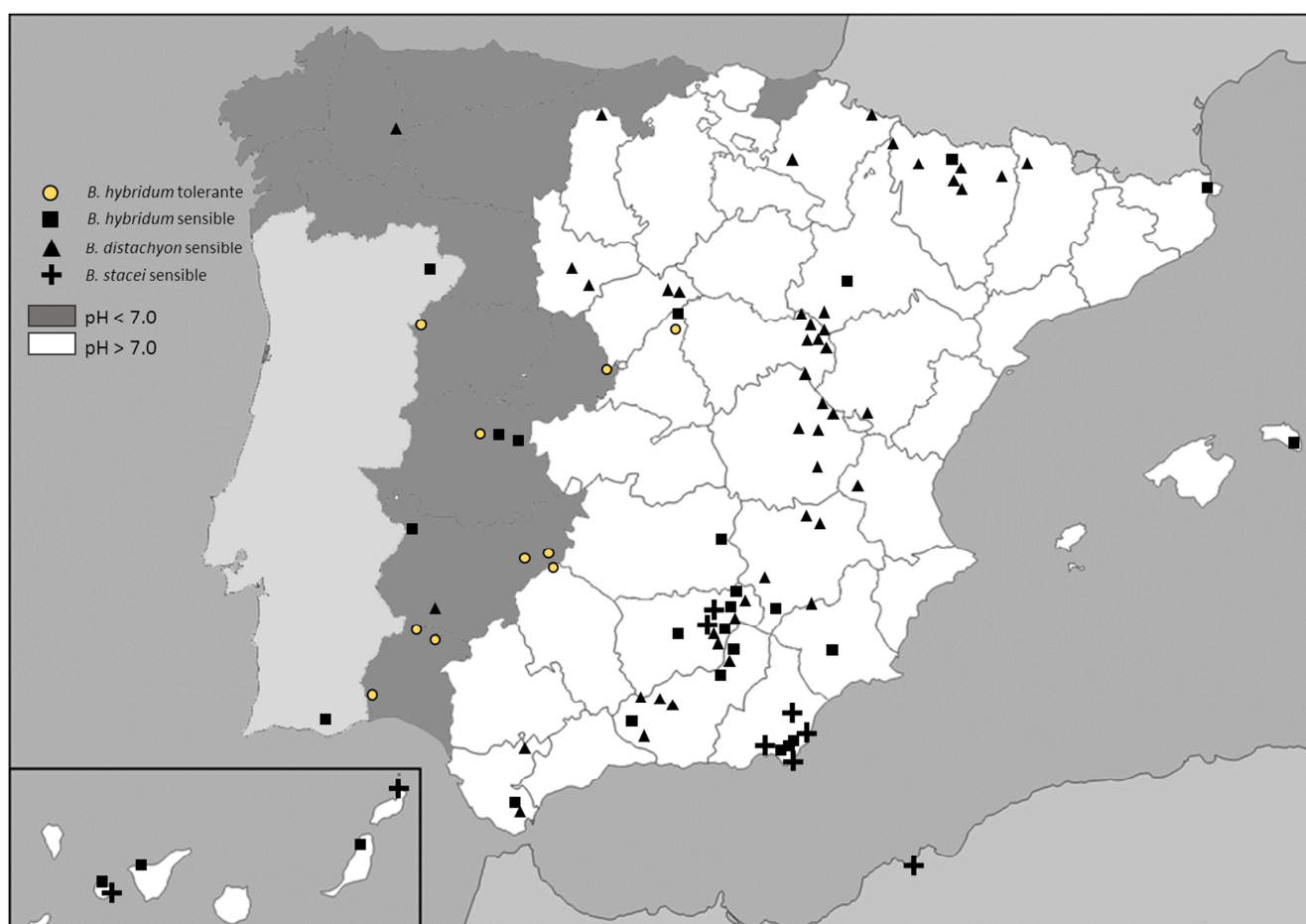


Figura 46. Mapa de España (incluidas Baleares y Canarias) y Portugal adaptado con los datos de pH según López y Grau (2004), Fernández y col, (1978) y Rita y Rossello (1989). Se indica la localización por provincias de todas las líneas diploides de *B. distachyon* (*Bd*), diploides de *B. stacei* (*Bs*) y alotetraploides de *B. hybridum* (*Bh*).



VI. DISCUSIÓN

1. Evaluación del crecimiento de la raíz después del tratamiento con Al

La estimación del crecimiento relativo de la raíz es el sistema usualmente utilizado en la mayoría de las especies de plantas para clasificar los genotipos como sensibles o tolerantes al estrés por Al. Los resultados del crecimiento relativo de la raíz en *Brachypodium* indican la existencia de una línea diploide ($2n=10$) tolerante (ABR8) de *B. distachyon* y diez líneas alotetraploides tolerantes de *B. hybridum* ($2n=30$). Estas estimaciones del crecimiento relativo de la raíz se llevaron a cabo usando concentraciones de Al a 10 y 40 μM . Por lo tanto, *B. distachyon* (Bd) y *B. hybridum* (Bh) son especies sensibles comparadas con el alto grado de tolerancia al estrés por Al que exhiben gramíneas tales como avena, centeno y arroz, las cuales toleran concentraciones de 300, 150 y 160 μM , respectivamente (Radmer y col. 2012, Gallego y Benito 1997, Famoso y col. 2010), todas evaluadas mediante cultivo hidropónico. Sin embargo, las especies del género *Brachypodium* (Bd y Bh), con el método de cultivo hidropónico de evaluación, muestran un mayor grado de tolerancia que cebada y *Arabidopsis* que pueden soportar concentraciones de Al de 5 y 4 μM , respectivamente (Furukawa y col. 2007, Kobayashi y Koyama 2002), inclusive el grado de tolerancia es similar al exhibido en trigos alohexaploides que toleran concentraciones de 50 μM (Famoso y col. 2010). Se pudo apreciar también que la mayoría de los ecotipos tolerantes alotetraploides mostraron un nivel de inhibición del recrecimiento de la raíz más bajo que la línea tolerante diploide ABR8 (Anexo 1). Estos resultados sugieren que los ecotipos tetraploides son más tolerantes al estrés por Al que los diploides.

2. Evaluación de la tolerancia al estrés por Al sin necesidad de tinción

El método de evaluación de la tolerancia al estrés por Al por medio del crecimiento relativo de la raíz en *Brachypodium* ha permitido detectar una asociación entre el crecimiento relativo de la raíz y la coloración de esta después el tratamiento con Al. Los genotipos tolerantes tienen un mayor crecimiento después del tratamiento con Al y presentan siempre en el ápice de la raíz un color blanquecino y aspecto normal, mientras que los genotipos sensibles, de menor o nulo crecimiento de la raíz, tienen el ápice de color marrón y un aspecto irregular. Este síntoma es posible observarlo tanto en especies diploides como alotetraploides. Teniendo en cuenta esta asociación, se ha realizado una clasificación de las 69 líneas diploides Bd, nueve líneas diploides Bs y 38 líneas Bh; encontrando que de todas las líneas utilizadas en este estudio eran sensibles excepto la línea diploide Bd, ABR8, y diez alotetraploides Bh. De todas las técnicas utilizadas para clasificar la tolerancia al estrés por Al en especies vegetales (Carver y col. 1988, Rajaram y Villegas 1990, Ruiz-Torres y col. 1992, Rengel y Jurkic 1993, Baier y col. 1995), esta es la primera vez que se describe un sistema (mediante técnica de cultivo hidropónico) capaz de discriminar genotipos tolerantes y sensibles observando sólo el ápice de la raíz sin llevar a cabo tinción alguna.



Teniendo en cuenta que del número total de líneas estudiadas diploides y alotetraploides, 69 y 38, respectivamente; la tolerancia al estrés por Al es muy poco frecuente en las líneas diploides (1/69), sin embargo, es más frecuente en las alotetraploides (10/38). La ploidía puede jugar un papel clave en la resistencia de las especies vegetales al estrés abiótico. En una conferencia internacional, el Dr. Raman (2013) dio a conocer la variabilidad genética de la tolerancia al estrés por Al entre diferentes citotipos del género *Triticum*. Los resultados indicaron que los genotipos hexaploides tenían un alto nivel de tolerancia comparado con las especies diploides y alotetraploides. Según Manzaneda y col. (2012) los citotipos (especies) de *Brachypodium* difieren significativamente en su tolerancia a la sequedad, siendo más eficientes en el uso del agua las especies alotetraploides (*Bh*) que las especies diploides (*Bd* y *Bs*). De igual forma, Keeler (1990) ha observado una relación entre la aridez y la variación de la ploidía. Las especies vegetales poliploides son particularmente comunes en hábitat afectados por condiciones climáticas fluctuantes y/o bajo condiciones climáticas extremas (Brochmann y col. 2004). Por otra parte, plantas de *Citrus* de diferente grado de ploidía bajo condiciones de estrés salino exhibieron distintas adaptaciones, siendo más tolerantes las tetraploides que las diploides (Shafieizargar y col. 2013).

3. Evaluación de la tolerancia al estrés por Al con tinciones histoquímicas

La mayoría de las raíces tratadas con diferentes métodos de tinción muestran siempre los mismos resultados en presencia de Al. Todas las raíces de las líneas sensibles (diploides y alotetraploides) se tiñen intensamente mientras que las raíces de las líneas tolerantes se tiñen muy poco o simplemente no muestran coloración. Las raíces de las líneas sensibles teñidas con hematoxilina y morín acumulan más aluminio que las raíces de las líneas tolerantes. Comparando genotipos tolerantes y sensibles al estrés por Al en trigo (Polle y col. 1978, Delhaize y col. 1993), maíz (Cançado y col. 1999) y *Arabidopsis* (Larsen y col. 1996) se han obtenido resultados similares. Los resultados parecen indicar que la tolerancia al estrés por Al de ABR8 y las líneas tolerantes alotetraploides está basada en mecanismos de exclusión del Al.

En las raíces de líneas sensibles de *Brachypodium* se ha detectado un mayor grado de peroxidación lipídica y una mayor producción de peróxido de hidrógeno que en las raíces de líneas tolerantes. El aumento de la peroxidación lipídica causada por el Al también se ha descrito en ápices de raíces de soja (*Glycine max*) en solución nutritiva (Horst y col. 1992). Tahara y col. (2008) han mostrado que las especies reactivas de oxígeno (ROS) se generan rápidamente en raíces de *Melaleuca* después de tratamiento con Al y en mayor cantidad en especies sensibles que en tolerantes. La inducción de ROS por Al también se ha encontrado en raíces de maíz y *Allium cepa* (Jones y col. 2006, Achary y col. 2008). Además, Yamamoto y col. (2001, 2002) han descrito una correlación entre los niveles de ROS y la capacidad de inhibición del crecimiento de la raíz en cultivo de células de tabaco y Devi y col. (2003) observaron que una alta capacidad para eliminar ROS daba lugar a un aumento de la tolerancia.



Por tanto, los cultivares tolerantes están mejor preparados fisiológicamente para soportar el estrés oxidativo producido por el Al, debido quizás a una menor penetración del Al en sus raíces.

La capacidad para sintetizar calosa en células dañadas es un mecanismo de protección que genera una barrera física que puede inducirse entre otros factores, por metales pesados. El aluminio induce la formación de calosa que protegería la raíz, pudiéndose usar este síntoma como indicador para clasificar genotipos sensibles y tolerantes (Bacic y col. 2009). Sin embargo, nuestros resultados en *Brachypodium* no indican con claridad la acumulación de calosa en la raíz, ni permiten diferenciar entre genotipos tolerantes y sensibles, tanto en diploides como en alotetraploides. En presencia de Al la tinción de azul de anilina detecta la calosa acumulada en maíz, guisante y *Arabidopsis* (Vardar y col. 2011, Yamamoto y col. 2001, Ermolayev y col. 2003), observándose un color blanquecino en el ápice de la raíz. En cambio sin Al las raíces presentan un color azulado. En trigo se ha cuantificado la acumulación de calosa en la raíz en dos genotipos tolerantes (Atlas 66 y PT741) y dos genotipos sensibles (Scout 66 y Katepwa) y se ha encontrado que las líneas sensibles tienen mayor acumulación de calosa que las líneas tolerantes (Schreiner y col. 1994). Si se observa detenidamente la Figura 19d, los genotipos sensibles muestran pequeñas heridas brillantes en la zona de elongación y también pelos radiculares blanquecinos muy cerca de la cofia de la raíz que no se ven en los genotipos tolerantes. Este resultado sugiere que los genotipos sensibles estarían utilizando el mecanismo de protección con calosa, pero no los tolerantes, como sucede en trigo.

Hay que añadir que nuestros resultados se han obtenido después de tratar 24 h con Al. La acumulación de calosa puede detectarse a tiempos cortos (Bacic y col. 2009) y también en tiempos largos, de más de 40 horas (Schreiner y col. 1994, Vardar y col. 2011). Tal vez si se hacen ensayos a distintos tiempos de tratamiento con Al en *Brachypodium* se pueda observar la acumulación de calosa y posiblemente diferenciar entre genotipos sensibles y tolerantes en *Brachypodium*.



La acumulación de pectinas difiere entre los genotipos sensibles y tolerantes en *Brachypodium*. La acumulación de pectinas, detectada con la tinción rojo de rutenio, es mayor en la raíz del genotipo diploide tolerante ABR8 que en la raíz del genotipo diploide sensible ABR1, en presencia de Al. Este resultado es similar al encontrado en centeno, los genotipos tolerantes (Ailés, Petkus e Imperial) tratados con Al presentan una mayor cantidad de pectinas que el genotipo sensible (Riodeva) (Abd El-Moneim y col. 2014a). Sin embargo, los genotipos alotetraploides de *Brachypodium* muestran distinto patrón que los diploides. El genotipo tolerante alotetraploide (CB) tiene una mayor cantidad de pectinas que el genotipo sensible (GRA788) en ausencia de Al. Cuando las raíces se exponen al estrés por Al, los dos genotipos muestran un aumento en la cantidad de pectinas, pero, el genotipo tolerante (CB) muestra una mayor acumulación en la zona de elongación que en la punta de la raíz.

La composición de la pared celular cambia como consecuencia de la exposición al aluminio, especialmente en las pectinas (Eticha y col. 2005, Hossain y col. 2006, Yang y col. 2008b). La mayor acumulación de Al en la pared celular (Ma y col. 2004, Wang y col. 2004, Tice y col. 1992, Huett y Menary 1979) puede ser responsable de la reducción de la capacidad de extensión de esta en plantas tratadas con Al (Jones y col. 2006). Variedades tolerantes de maíz y trigo muestran altos grados de metil-esterificación de pectinas que producen una menor entrada de Al en la pared celular (Eticha y col. 2005, Yang y col. 2008b).

De lo anterior se desprende que las pectinas juegan un papel importante en la tolerancia al estrés por Al en *Brachypodium* y, por tanto, la mayor acumulación de pectinas y la menor acumulación de Al en genotipos tolerantes de *Brachypodium* (ABR8 y alotetraploides tolerantes) podría ser un claro indicador de regeneración de pared celular primaria que estaría relacionado con el mayor crecimiento de la raíz observado en los genotipos tolerantes después del tratamiento con Al.

En resumen, nuestros estudios de tolerancia al estrés por aluminio en *Brachypodium* indican cinco cambios o sucesos diferentes que están correlacionados: el crecimiento relativo de la raíz, la acumulación de aluminio (observada con los tintes, hematoxilina y morín), la peroxidación lipídica y producción de H_2O_2 (observados con el reactivo de schiff y DCF-DA), la muerte celular (con Azul de Evans) y la acumulación de pectinas (observada con rojo de rutenio).

La alta correlación entre la clasificación de la tolerancia en las líneas y ecotipos usando el método de crecimiento relativo de las raíces y usando los diferentes métodos de tinción histoquímica indican que las distintas tinciones usadas en *Bd* y *Bh* pueden ser utilizadas para clasificar las líneas como tolerantes o sensibles. También es posible clasificar en *Brachypodium* los diferentes genotipos analizados sin usar ningún método de tinción.

Además, los métodos de tinción utilizados ponen de manifiesto que la tolerancia al estrés por Al en *Brachypodium* probablemente se basa en la actuación de varios mecanismos: mecanismos relacionados con el mantenimiento de la pared celular y con la eliminación de las especies reactivas de oxígeno.

4. Cuantificación de ácidos orgánicos

Uno de los mecanismos más importantes de resistencia al estrés por Al descrito en plantas es la exudación de ácidos orgánicos. Estos ácidos orgánicos quelan el Al, minimizando el impacto de la toxicidad (Delhaize y Ryan 1995, Kochian y col. 2005). El trigo sarraceno, maíz, judías y trigo exudan ácidos orgánicos tales como citrato, malato y oxalato cuando se someten a estrés por Al (Miyasaka y col. 1991, Delhaize y col. 1993, Pellet y col. 1995, Ma y col. 1997, Ryan y col. 2009). Nuestros resultados con dos métodos diferentes de cuantificación (enzimático y por RP-HPLC) indican que raíces de ABR8 (línea diploide tolerante) secretan altas cantidades de malato y citrato comparadas con las raíces de ABR1 (línea diploide sensible). De la misma manera, las raíces de CB (ecotipo tolerante alotetraploide) exudan mayor cantidad de malato comparada con la línea sensible GRA788, sin embargo, las alotetraploides exudan menos cantidad de citrato que la diploide tolerante ABR8. La diploide tolerante ABR8 y la alotetraploide CB tienen una secreción de malato constitutiva y sólo ABR8 tiene una secreción de citrato inducida en presencia de Al. Se han descrito dos patrones de secreción de ácidos orgánicos. En el patrón de tipo I no se observa un retraso perceptible entre la adición del Al y el inicio de la liberación de ácido orgánico. Por ejemplo, los genotipos tolerantes de trigo exudan malato a los 20 minutos del tratamiento con Al (Delhaize y col. 1993, Ryan y col. 1995) y los de trigo sarraceno ácido oxálico a los 30 minutos de exposición (Ma y col. 1997). En el patrón tipo II, la secreción de ácidos orgánicos comienza varias horas después de la exposición al Al. En centeno, la exudación de malato y citrato tardan 6 y 10 horas, respectivamente (Li y col 2000). Creemos que la línea tolerante diploide ABR8 tiene un patrón de exudación de malato tipo I y una secreción de citrato tipo II. Igualmente, el ecotipo alotetraploide tolerante CB tendría un patrón tipo I de exudación de malato. Por tanto, probablemente la exudación de ácidos orgánicos está involucrada en la tolerancia al estrés por Al en *B. distachyon* y *B. hybridum*.

La existencia de variabilidad para la tolerancia al estrés por Al en *B. distachyon* y *B. hybridum*, la fácil clasificación de diferentes genotipos como tolerantes o sensibles mediante el crecimiento relativo de la raíz, las tinciones histoquímicas, y la exudación de ácidos orgánicos convierten a *Brachypodium* en una especie modelo para estudiar la tolerancia en la familia de las Poaceae.



5. Análisis de expresión génica en *Brachypodium*

Se ha elaborado una tabla resumen de los niveles relativos de expresión de dos tejidos diferentes (raíz y hoja) de 21 genes candidatos de tolerancia al estrés por AI, para facilitar la discusión de los resultados. Los diferentes niveles de expresión se han indicado con diferente intensidad de coloración y las comparaciones deben llevarse a cabo para cada gen por separado, pero no entre genes distintos. (Tabla 18).

Para los estudios de expresión de genes candidatos a la tolerancia al estrés por AI en *Brachypodium*, se han seleccionado, en primer lugar, genes de especies vegetales que han mostrado algún grado de contribución a la tolerancia y genes de la misma familia pero que no contribuyen a la tolerancia o que aún no se ha detectado su contribución a la tolerancia. Entre ellos están grupos de genes que codifican para proteínas transmembrana que transportan ácidos orgánicos, genes relacionados con el ciclo de Krebs, genes relacionados con el estrés oxidativo y genes implicados en la formación de la pared celular.

5.1. Genes de la familia *ALMT*

De los genes relacionados con el grupo que codifica para proteínas transportadoras de ácido málico, el gen *BdALMT1* ortólogo del gen *TaALMT1* de trigo y del gen *ScALMT1* de centeno, es el único que presentan una clara diferencia en la cantidad de transcritos en la raíz, entre una línea tolerante y una línea sensible, tanto en *B. distachyon* como en *B. hybridum*, mientras que otros genes de la misma familia *BdALMT2* y *BdALMT3* tienen la misma cantidad de transcritos en raíces de tolerantes y sensibles y se expresan mucho más en hoja que en raíz. Además, la gran diferencia de transcritos del gen *BdALMT1* en la raíz entre tolerantes y sensibles no se observa en otros genes analizados en este estudio (Tabla 18). Así pues, nuestros resultados indican que el gen *BdALMT1* se expresa más en raíz que en hoja en las líneas tolerantes y su expresión es constitutiva, tal como sucede con el gen *TaALMT1* de trigo (*Triticum aestivum*). El gen *TaALMT1*, es el gen más importante descrito hasta la fecha que controla la tolerancia en trigo, este gen da lugar a una proteína de membrana que transporta malato. En líneas tolerantes de trigo se ha observado una alta cantidad de transcritos en las raíces y menos en las hojas, y en las líneas sensibles se ha observado muy poca cantidad de transcritos en las raíces. Además, este gen tiene un modelo de expresión constitutiva en las líneas tolerantes de trigo y no se induce por el tratamiento con AI (Sasaki y col. 2004). Estas cantidades de transcritos y modelos de expresión en trigo son semejantes a las que hemos observado en el gen *BdALMT1* en dos líneas tolerantes de especies diferentes de *Brachypodium*, ABR8 (*Bd*) y CB (*Bh*).



Tabla 18: Cuadro resumen de expresión génica mediante RT-PCR cuantitativa (RT-PCRc) y semicuantitativa (RT-PCRsemic) de diversos genes en las líneas diploides (ABR1 y ABR8) y alotetraploides (CB y GRA788).

	Gen	Cantidad relativa de transcritos en raíz				Cantidad relativa de transcritos en hoja			
		ABR8		ABR1		ABR8		ABR1	
		-AI	+AI	-AI	+AI	-AI	+AI	-AI	+AI
	RT-PCRc								
Proteínas transmembrana	<i>BdALMT1</i>								
	<i>BdALMT2</i>								
	<i>BdALMT3</i>								
	<i>BdMATE1</i>								
	<i>BdMATE2</i>								
	<i>BdMATE3</i>								
Metabolismo de ácidos orgánicos	<i>BdSTOP1</i>								
	<i>BdMDH1</i>								
	<i>BdMDH2</i>								
	<i>BdFH</i>								
	<i>BdCS</i>								
	<i>BdME</i>								
Estrés oxidativo	<i>BdCSOD1</i>								
	<i>BdCSOD2</i>								
	<i>BdMSOD1</i>								
	<i>BdtDT</i>								
	RT-PCRsemic								
Pared celular	<i>BdPME</i>								
	<i>BdXTH5</i>								
	<i>BdXTH15</i>								
	<i>BdXTH14</i>								
	<i>BdXTH31</i>								
	Gen	Cantidad relativa de transcritos en raíz				Cantidad relativa de transcritos en hoja			
		CB		GRA788		CB		GRA788	
		-AI	+AI	-AI	+AI	-AI	+AI	-AI	+AI
	RT-PCRc								
Proteínas transmembrana	<i>BdALMT1</i>								
	<i>BsALMT1</i>								
	RT-PCR semic								
	<i>BdALMT2</i>			S/I	S/I			S/I	S/I
	<i>BdALMT3</i>			S/I	S/I			S/I	S/I
	<i>BdMATE1</i>			S/I	S/I			S/I	S/I
Pared Celular	<i>BdMATE2</i>			S/I	S/I			S/I	S/I
	<i>BdMATE3</i>			S/I	S/I			S/I	S/I
	<i>BdSTOP1</i>			S/I	S/I			S/I	S/I
	<i>BdXTH5</i>								
	<i>BdXTH15</i>								
	<i>BdXTH14</i>								
	<i>BdXTH31</i>								
	Leyenda	+ARN							-ARN

S/I= Sin información



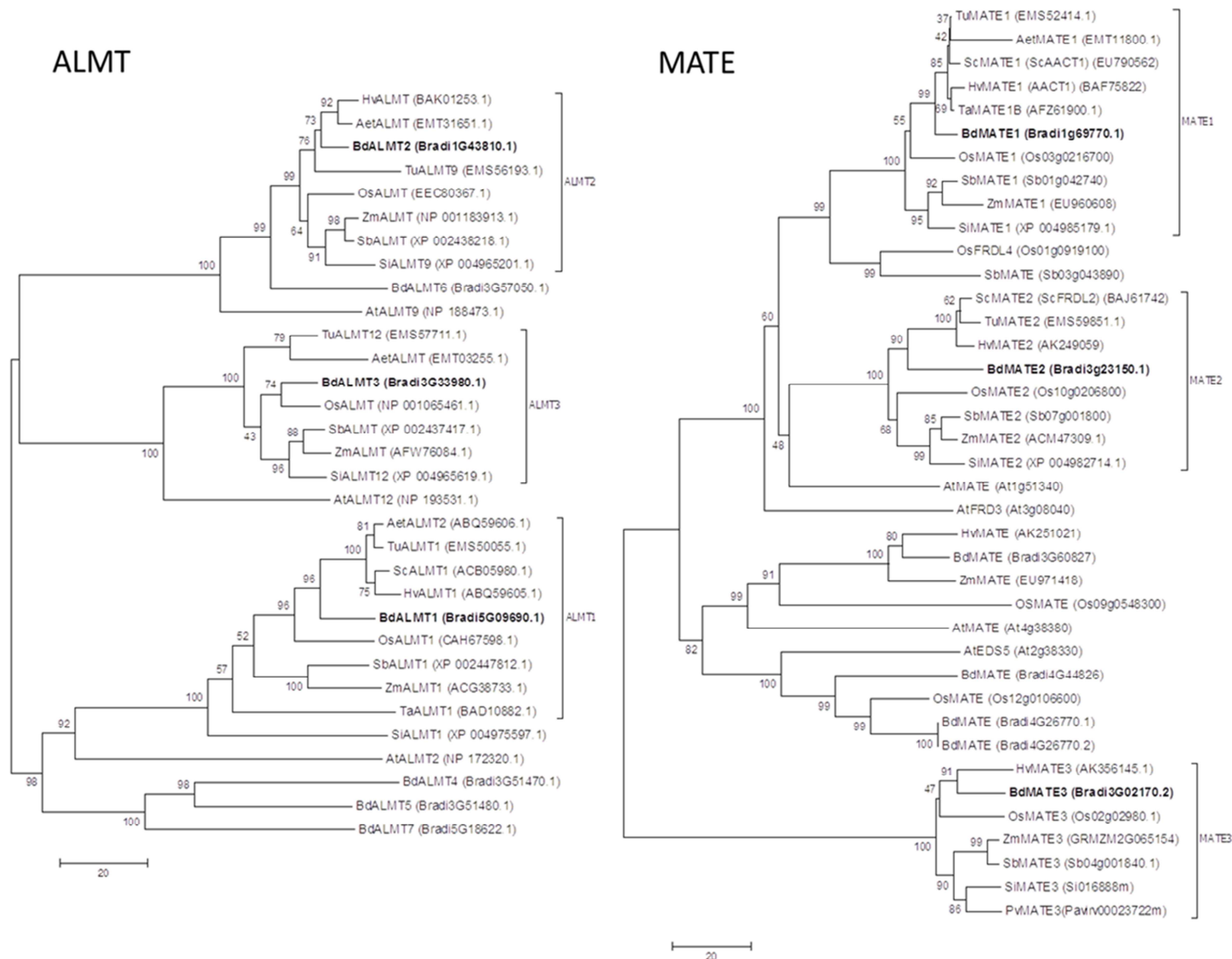
Los distintos modelos de expresión (inducido o constitutivo) que presenta el gen *ALMT1* en distintas líneas tolerantes de diferentes especies de la familia Poaceae no deja claro cual es el patrón esperado en la respuesta de las plantas al estrés por Al. En las líneas tolerantes de *Brachypodium* (ABR8 y CB) el gen *BdALMT1* tiene un modelo constitutivo de expresión pero las dos líneas sensibles de *Brachypodium* (ABR1 y GRA788) que hemos estudiado tienen un modelo de expresión inducido, siendo este tipo de modelo igual al de líneas tolerantes y sensibles en especies de Poaceae como centeno (*ScALMT1*) (Fontecha y col. 2007, Collins y col. 2008) y *Holcus lanatus* (*HIALMT1*) (Chen y col. 2013). En centeno, el gen *ScALMT1* se induce en las raíces de las plantas tolerantes y sensibles, pero lo hace mucho más intensamente en las tolerantes.

En la especie modelo *Arabidopsis* hay 14 miembros conocidos de la familia ALMT, y de estos un estudio de tolerancia al estrés por Al detectó el gen *AtALMT1* (At1g08430), entre otros, basándose en modelos de expresión génica (Hoekenga y col. 2006). Después mediante análisis mutacionales se confirmó que el gen *AtALMT1* era esencial en la tolerancia al estrés por Al en *Arabidopsis* (Hoekenga y col. 2006). En la base de datos de la secuencia genómica de *Brachypodium distachyon*, hemos encontrado siete genes miembros de la familia ALMT de los cuales hemos estudiado la expresión génica de tres (*BdALMT1*, *BdALMT2* y *BdALMT3*). Los estudios de relaciones filogenéticas, con secuencias de las proteínas codificadas por los siete genes *BdALMT* y con las secuencias de proteínas de la familia ALMT de otras especies de Poaceas y de *Arabidopsis*, indican que el gen *BdALMT1* es ortólogo de los genes *TaALMT1* de trigo y *ScALMT1* de centeno (Figura 47). Este resultado, junto con los estudios de expresión génica de *BdALMT1* y exudación de malato, sugiere que *BdALMT1* es muy probablemente un buen gen candidato de tolerancia al estrés por Al en *Brachypodium*. Por tanto, en el futuro se llevarán a cabo estudios mutacionales mediante obtención de “knockout” y “knockdown” que permitan demostrar la implicación de este gen en la tolerancia.

La exudación de ácido málico mediada por la proteína *TaALMT1* se activa por Al y observándose una mayor exudación en las líneas tolerantes que en las sensibles de trigo, siendo la exudación de tipo constitutiva consistente con una expresión génica constitutiva de *TaALMT1* (Sasaki y col. 2004, Raman y col. 2005). Es de destacar, que la expresión constitutiva del gen *BdALMT1* en *Brachypodium* coincide con el patrón de exudación de tipo I (constitutivo) de ácido málico. Sugiriendo este resultado que *BdALMT1* probablemente este involucrado en la exudación de málico en *Brachypodium* y en la tolerancia al estrés por Al.

Todos estos datos pueden sugerir que el gen *BdALMT1* es un fuerte candidato de tolerancia al estrés por Al en *Brachypodium*. Es posible que *Brachypodium* tenga mecanismos fisiológicos y moleculares de tolerancia al estrés por Al similares a los de *Triticum aestivum*, facilitando su uso como especie modelo para trigo y, en general, para otras Poaceae, para tratar de resolver muchos de las lagunas e incógnitas de la tolerancia al estrés por Al.

Figura 47. Dendrograma obtenido con las hipotéticas proteínas *BdALMT* y *BdMATE* de *B. distachyon*, de varias especies de Poaceae y *A. thaliana* usando el número de diferencias para estimar las distancias, Neighbour Joining como método de agrupamiento y un bootstrap de 10.000 réplicas (Mega 6.0). Las secuencias de estas proteínas fueron obtenidas en las bases de datos del NCBI y Phytozome. Las proteínas de *BdALMT1*, *BdALMT2*, *BdALMT3*, *BdMATE1*, *BdMATE2* y *BdMATE3* están destacadas con negro



5.2. Genes de la familia *MATE*

En *Brachypodium* como en otros estudios de Poaceae relacionados con tolerancia al estrés por Al, hemos comenzado los estudios de expresión buscando genes ortólogos de proteínas de la familia MATE que codifican para proteínas transmembrana de transporte de citrato activadas por Al. Los genes de la familia *MATE1* son de los más estudiados, entre ellos están los genes *SbMATE* de sorgo, *HvMATE1* de cebada, *ScMATE1* de centeno y *TaMATE1* de trigo. Otro gen *MATE* recientemente descrito en centeno es el gen *ScFRDL2* (*ScMATE2*). En *Brachypodium* existen 49 genes que codifican proteínas de la familia MATE, de estas proteínas seleccionamos siete cuya secuencia presentará la máxima similitud con las secuencias de proteínas de la familia *MATE1* y *MATE2* de Poaceas y de *Arabidopsis* relacionadas con estrés por Al. De las siete seleccionadas la proteína *BdMATE1* agrupaba en el mismo “cluster” y era ortóloga de *TaMATE1* de trigo, *ScMATE1* de centeno y de otras proteínas *MATE1* de Poaceas. *BdMATE2* según las relaciones filogenéticas obtenidas fue ortóloga de *ScFRDL2* (*ScMATE2*) y de otras *MATE2* de Poaceas. *BdMATE3* estaba en un “cluster” distinto a *BdMATE1* y a *BdMATE2*, indicando que pertenece a otra familia de proteínas MATE diferentes que hemos denominado *MATE3*. Esta proteína se seleccionó por encontrarse el gen codificante en una región del cromosoma 3 de *Brachypodium* sinténica del brazo corto del cromosoma 6R de centeno que posee un gen de tolerancia al estrés por Al (Figura 47).

Los genes *BdMATE1* y *BdMATE2* se expresan más en raíz que en hojas tanto en líneas tolerantes como sensibles de *Bd* y *Bh* (Tabla 18). Sin embargo, el gen de *Brachypodium* *BdMATE3*, cuya contribución a la tolerancia al estrés por Al en otras especies de Poaceas no se ha demostrado, presentó mucho más expresión en hoja que en raíz, tanto en líneas tolerantes como sensibles de *Bd* y *Bh* (Tabla 18).

El papel de las proteínas MATE en la tolerancia al estrés por Al se observó primero en sorgo (Magalhaes y col. 2007) y cebada (Furukawa y col. 2007) y más tarde en trigo (Ryan y col. 2009) y *Arabidopsis* (Liu y col. 2009). En sorgo, el gen *SbMATE* se expresa sólo en la punta de la raíz de los genotipos tolerantes al tratarlos con Al (Magalhaes y col. 2007), el gen *AtMATE1* en *Arabidopsis* (Liu y col. 2009) y los genes *ScFRDL1* (*ScMATE1*) y *SCFRDL2* (*ScMATE2*) (Yokosho y col. 2010) de centeno también se expresan más en raíz que en hoja.

En este estudio, las raíces de la línea tolerante ABR8 tratadas sin Al tienen al menos dos veces más transcritos de *BdMATE1* y *BdMATE2* que la línea sensible ABR1 (Tabla 18). Por lo tanto, *BdMATE1* y *BdMATE2* podrían jugar algún papel en la tolerancia al estrés por Al de *Brachypodium distachyon* ya que las cantidades de esos transcritos son más altas en la línea tolerante que la sensible, y además se expresan más en raíz (que es el tejido afectado directamente por el efecto tóxico del Al) y se expresan pobremente en hoja. A esto hay que sumar que la línea tolerante ABR8 tuvo una fuerte inducción de citrato al tratarlo con Al, sin embargo, esta inducción no es consistente con los datos de expresión del gen *BdMATE1* y *BdMATE2* ya que estos genes no se inducen por Al. Este resultado hace pensar que tal vez estos genes no expliquen la tolerancia al estrés por Al detectada en nuestras líneas. En nuestra



línea tolerante alotetraploide de *Brachypodium* (CB) se ha observado un modelo de expresión distinto a la tolerante diploide (ABR8) al tratarlas con Al. Sin embargo, en la alotetraploide no sabemos cuál es realmente el nivel de expresión que tienen los genes *MATEs*, ya que la expresión observada en las PCR semicuantitativas y cuantitativas probablemente sea la suma de las expresiones de los genes procedentes de cada genomio (*Bd* y *Bs*).

Los genes *SbMATE* (Magalhaes y col 2007) y *ScFRDL2* (Yokosho y col. 2010) se inducen con Al y sus niveles de expresión están correlacionados con una mayor inducción de la exudación de citrato, pero, difieren cada uno de ellos en el tiempo de inducción del gen, en el primero tarda algunos días en inducirse y el otro algunas horas. Es probable también que uno de los genes *BdMATE1* y *BdMATE2* se haya inducido más en la línea tolerante ABR8 antes de las 24 hrs y no lo hayamos detectado. Sin embargo, los genes *HvMATE1* (*HvAACT1*) (Furukawa y col 2007) y *TaMATE1* (Ryan y col. 2009) no tienen un modelo de expresión inducida, estos se expresan de forma constitutiva en la raíz y se activan por Al estando su expresión correlacionada con la exudación de citrato en cultivares tolerantes de cebada y trigo. Recientemente, la exudación de citrato y un incremento de la tolerancia al estrés por Al en raíces de cebada y trigo se ha asociado a la presencia de un transposón en la región promotora (“upstream”) de los genes *HvMATE1* y *TaMATE1*, respectivamente (Fujii y col. 2012; Tovkach y col. 2013).

Algunos autores han dado mayor relevancia en la tolerancia a un gen en particular por su modelo de expresión génica relacionándolo con el modelo de exudación del ácido orgánico correspondiente, incluso analizando sólo un cultivar de una especie cuyo grado de tolerancia es desconocido. Es lo que ha ocurrido con un trabajo descrito por Yokosho y col. (2010), quienes sugirieron que en centeno el gen *ScMATE2* (*ScFRDL2*) estaría involucrado en la tolerancia al estrés por Al, ya que el gen se induce y también se induce la exudación de ácido cítrico. Sin embargo, Yokosho y col. (2010) no relacionaron el gen *ScFRDL1* (gen ortólogo del gen *ScAACT1* descrito por Silva-Navas y col. 2012) con la tolerancia, ya que no se inducía. Sin embargo, las diferencias de inducción génica se pueden encontrar inclusive en cultivares con distinto grado de tolerancia al estrés por Al de una misma especie. Silva-Navas y col. (2012) hicieron un estudio más detallado y encontraron diferentes patrones de expresión del gen *ScAACT1* (*ScMATE1=ScFRDL1*) en distintos cultivares (Riodeva, Imperial, Petkus, 2672/4 y Ailés) con diferentes grados de tolerancia en centeno, así el gen *ScAACT1* en el cultivar sensible Riodeva se induce mientras que en el cultivar tolerante Ailés no se induce. Sin embargo, en Riodeva se encontró un QTL que coincidía en posición con el gen *ScMATE1*, sugiriendo que dicho gen es un buen candidato para la tolerancia al estrés por Al. Lo mismo ocurre en *Brachypodium* con nuestra línea sensible diploide ABR1, en dicha línea se inducen claramente en presencia de Al los genes *BdMATE1* y *BdMATE2*, pero en la tolerante diploide ABR8 no se inducen (Tabla 18). Por tanto, no es fácil por el momento, decidir si estos genes (*BdMATE1* y *BdMATE2*) pueden o no estar involucrados en la tolerancia al estrés por Al en *Brachypodium*.

Teóricamente, el citrato quela el Al más eficientemente que el malato, sin embargo, actualmente al gen que contribuye más a la tolerancia al estrés por Al en trigo, centeno y



Arabidopsis es el transportador de malato *ALMT1* (Sasaki y col. 2004; Hoekenga y col. 2006; Fontecha y col. 2007; Collins y col. 2008; Tovkach y col. 2013). Teniendo en cuenta que los ortólogos de la familia *MATE1* como los genes de trigo (*TaMATE1*), cebada (*HvMATE1*) y centeno (*ScMATE1*), y que el gen *ScMATE2* (*ScFRDL2*) de centeno han sido involucrados en la exudación de citrato y en la tolerancia al estrés por Al en esas especies vegetales, los genes *BdMATE1* y *BdMATE2* de *B. distachyon* podrían también estar involucrados en la exudación de citrato y en la tolerancia.

En resumen, los patrones de expresión de los genes *ALMT* y *MATE* por efecto del estrés por Al en genotipos tolerantes de distintas especies vegetales son variables, en algunos casos se produce inducción y en otros su expresión es constitutiva. Tal vez, uno de los factores más importantes sea la cantidad de transcritos presentes en los genotipos tolerantes y sensibles. Creemos que *BdALMT1*, *BdMATE1* y *BdMATE2* debido a que son genes que se expresan principalmente en la raíz y, en mayor cantidad en la línea *Bd* tolerante (ABR8) que en la línea *Bd* sensible (ABR1), serían buenos candidatos de tolerancia al Al en *B. distachyon*.

5.3. Gen *STOP1*

En relación a la familia génica *STOP*, en *Arabidopsis* el gen *AtSTOP1* regula la respuesta al bajo pH y la toxicidad por Al siendo inducido por estrés de protones y no por estrés con Al (Iuchi y col. 2007, Sawaki y col. 2009). Este gen codifica un factor de transcripción necesario para la expresión de varios genes, incluyendo *AtALMT1* y *AtMATE1*. El gen *OsART1* de arroz regula la expresión de múltiples genes, entre ellos los de tolerancia al estrés por Al y, tiene una función similar a *AtSTOP1*, estos genes codifican para factores de transcripción que poseen dedos de zinc ("zinc finger") Cys₂His₂. Sin embargo, el gen *OsART1* de arroz no es el ortólogo del *AtSTOP1*, es decir, no es el más semejante al *AtSTOP1* de *Arabidopsis*. *OsART1* muestra una expresión constitutiva en raíces de arroz (Liu y col 2009) y las plantas "knockout" para *OsART1* son sensibles al estrés por Al (Yamaji y col. 2009, Tsutsui y col. 2011). Nuestros resultados indican que el gen *BdSTOP1* presenta una expresión constitutiva en presencia de Al en raíces y hojas en la línea tolerante (ABR8) y sensible (ABR1) de *Brachypodium distachyon* (ver Tabla 18), siendo similar a los resultados descritos en *Arabidopsis*, arroz y semejante los encontrados recientemente en trigo para el gen *TaSTOP1* (Garcia-Oliveira y col. 2013). En todos estas especies, el gen *STOP1* no se induce por Al. Nuestro gen es además ortólogo del gen de centeno *ScSTOP1* y del gen de trigo *TaSTOP1* (comunicación personal de Silva-Navas y col. 2014). En centeno Silva-Navas y col. 2014 (comunicación personal) han demostrado que *ScSTOP1* codifica para un factor de transcripción que es capaz de compensar la pérdida de función del gen *AtSTOP1* de un mutante "knockout" de *Arabidopsis*. Por tanto, el gen de centeno está involucrado en la tolerancia al estrés por Al. Aunque, no está demostrado que *BdSTOP1* en *Brachypodium* esté involucrado en la tolerancia y en la expresión de los genes *BdALMT1* y *BdMATE1*, al menos su expresión constitutiva y el grado de homología con el de centeno hacen sospechar que pueda estar relacionado con la tolerancia.

5.4. Genes nucleares que codifican para enzimas mitocondriales y citosólicas involucradas en la síntesis de Ácidos Orgánicos

Los mecanismos de exclusión de Al basados en la exudación de los ácidos orgánicos son los que más se han estudiado como forma de protección contra el Al. Estos mecanismos de exclusión están relacionados con la actividad metabólica mitocondrial, debido a que es aquí donde se producen los ácidos orgánicos málico, cítrico y oxálico, ya descritos anteriormente e implicados en la quelación del Al^{3+} tóxico proveniente de la rizósfera. La síntesis de ácidos orgánicos se lleva a cabo dentro de la mitocondria, aunque el malato también puede sintetizarse fuera de la mitocondria, en el citosol. Para la producción de malato se necesita entre otras enzimas mitocondriales la intervención de la fumara (*FH*) y la enzima málico deshidrogenasa (*MDH*) y para la producción de citrato se necesita entre otras enzimas la citrato sintasa (*CS*), mientras que fuera de la mitocondria para la producción de malato se necesita como sustrato piruvato y la enzima málica dependiente de NADP (*ME*) (ver figura 8 en el apartado de Introducción) (Yang y col. 2013).

Se ha demostrado en distintas especies vegetales que un aumento de la actividad enzimática mitocondrial de enzimas como *CS* y *MDH* produce una mayor secreción de ácidos orgánicos en raíces tratadas con Al (Ligaba y col. 2004, Osawa y Kojima 2006, Yang y col. 2004, Yang y col. 2001). Nuestros resultados de expresión génica en *Brachypodium distachyon* indican que cuatro genes mitocondriales *BdMDH1*, *BdMDH2*, *BdFH* y *BdCS* se reprimen como consecuencia del estrés por Al, tanto en la línea tolerante (ABR8) como en la sensible (ABR1). Por lo tanto, en *Bd* no hay diferencia de modelo de expresión entre un genotipo tolerante y otro sensible, salvo la observación de una mayor represión de los genes *BdMDH1* y *BdFH* en la línea sensible que en la tolerante. Sin embargo, cabe destacar que los cuatro genes, en plantas no tratadas con Al, tiene una mayor cantidad de transcritos en raíz que en hoja, y en presencia de Al los niveles de los transcritos de la raíz bajan al mismo nivel que los de la hoja.

La ausencia de diferencia entre los niveles de expresión de los genes mitocondriales entre un genotipo tolerante (ABR8) y otro sensible (ABR1) en *Brachypodium distachyon*, no se correlaciona con los mayores niveles de exudación de malato y citrato que se han observado en la línea tolerante ABR8. Como se había dicho anteriormente hay trabajos que vinculan una mayor actividad enzimática mitocondrial con una mayor secreción de ácidos orgánicos, sin embargo, también hay trabajos (Hayes y Ma 2003, Gaume y col. 2001, Yang y col 2012, Chen y col. 2009) en los que no se detecta relación entre una mayor actividad enzimática mitocondrial y una mayor secreción de ácidos orgánicos activados por Al. Por ejemplo, los genotipos de trigo tolerantes y sensibles al aluminio no difieren en sus concentraciones internas de malato, aunque las variedades resistentes exudan 10 veces más malato que las sensibles (Delhaize y col. 1993). Además, una mayor expresión o una mayor cantidad del transcrito correspondiente de un gen no siempre da lugar necesariamente a una mayor actividad enzimática.

Hay pocos estudios de cambios de expresión de genes que codifican para enzimas mitocondriales producidos por Al. En uno de ellos, en centeno, una de las especies más



tolerantes al estrés por Al, se ha demostrado para los genes mitocondriales *ScMDH1* y *ScMDH2* una mayor cantidad de transcritos en raíz que en hoja, tanto en el cultivar tolerante (Petkus) como en el sensible (Riodeva), siendo la diferencia más grande en plantas no tratadas con Al (Abd El Moneim y col. 2014b). Estos datos son muy similares a los observados en la planta tolerante (ABR8) y sensible (ABR1) de *Brachypodium distachyon*, donde hubo más transcritos en las raíces que en la hoja, y además, más transcritos en raíces no tratadas con Al. También, en centeno se ha observado una represión de *ScMDH1* y *ScMDH2* por el tratamiento con Al (Abd El Moneim y col. 2014b).

Por otro lado, hay una enzima que interviene en la síntesis de malato pero cuya actividad enzimática no es mitocondrial sino citosólica. Nuestros resultados de expresión en *Bd* han puesto de manifiesto que el gen *BdME* muestra una expresión constitutiva que no está afectada por el estrés por Al. Además hay igual cantidad de transcritos en hoja que en raíz, y sus niveles de expresión génica son similares en el genotipo tolerante (ABR8) y el sensible (ABR1). Estos datos de expresión son diferentes a los niveles de expresión mostrados por las cuatro enzimas mitocondriales descritas anteriormente. Es posible que *BdME* no tenga una implicación directa en la producción de malato inducida por Al y quizás sus función bioquímica tenga que ver con otras necesidades metabólicas.

Creemos que los genes mitocondriales están influenciados por el estrés de Al en *Brachypodium distachyon* mostrando los cuatro genes estudiados (*BdMDH1*, *BdMDH2*, *BdFH* y *BdCS*) un modelo semejante de expresión génica, pero los niveles de expresión de estos genes son difíciles de relacionar con una mayor secreción de ácidos orgánicos (malato y citrato) en el genotipo tolerante ABR8. Sin embargo, existen trabajos en tomate en los que se han estudiado mutantes con una actividad muy baja (reprimida) de MDH y Fumarasa mitocondriales que muestran una disminución de la longitud de las raíces y un descenso del pH del exudado (Van der Merwe y col. 2009). Dicho descenso de pH puede ser debido a un aumento de la exudación de ácidos orgánicos. Además, en estos mutantes de tomate, con baja actividad MDH y Fumarasa (reprimidos), se activa la exudación de ácidos orgánicos, entre ellos málico y cítrico (Van der Merwe y col. 2009). Por tanto, la exudación de málico y cítrico observada en las líneas tolerantes de *Brachypodium* no solamente puede deberse a la actuación de genes transportadores de málico y cítrico (*BdALMT1*, *BdMATE1* y *BdMATE2*) también en parte podría deberse a la represión de los genes de *BdMDH1*, *BdMDH2*, *BdFU* y *BdCS* que codifican para las correspondientes enzimas mitocondriales.

5.5. Genes de SOD

La toxicidad por Al induce estrés oxidativo elevando los niveles de peroxidación lipídica y producción de ROS (Yamamoto y col 2001, Yamamoto y col 2002, Yin y col. 2010). Nuestros resultados indican que las líneas sensibles de *Brachypodium* (ABR1 y GRA788) tienen un mayor estrés oxidativo que las líneas tolerantes (ABR8 y CB), habiéndose detectado más peroxidación lipídica y más peróxido de hidrógeno en las líneas sensibles debido a la toxicidad del Al. El control de los niveles oxidativos se lleva a cabo por sistemas antioxidativos. Estas defensas

están compuestas por metabolitos (tales como ascorbato, glutatión, tocoferol, etc.) y enzimas que eliminan ROS como superóxido dismutasa (SOD), peroxidasa y catalasas (Alscher y col. 2002, Schützendübel and Polle 2002). Como consecuencia de los resultados de estrés oxidativo en las raíces de *Bd*, nos propusimos abordar estudios de cambios de expresión génica de tres genes que codifican enzimas de superóxido dismutasa (SOD) involucradas en la eliminación de ROS.

En *Brachypodium distachyon* hemos medido la expresión génica de tres genes que codifican enzimas SOD, dos genes pertenecientes al grupo que tiene como co-factor cobre/zinc que hemos denominado CSOD (*BdCSOD1* y *BdCSOD2*) y un gen perteneciente al grupo que tiene como co-factor el metal manganeso que hemos denominado MSOD (*BdMSOD1*). Los resultados han revelado que sólo los genes (*BdCSOD1* y *BdCSOD2*) pertenecientes a los genes del grupo *BdCSOD* tienen mayores niveles de expresión génica en raíz que en hoja. Sin embargo, el gen *BdMSOD1* muestra igual cantidad de transcritos en raíz y en hoja. Además, los dos genes *BdCSOD1* y *BdCSOD2* presentan una mayor cantidad de transcritos en la línea sensible (ABR1) que en la línea tolerante (ABR8), y en ninguno de los tres genes (*BdCSOD1*, *BdCSOD2* y *BdMSOD1*) se observó inducción o represión por el tratamiento con Al, teniendo todos un modelo de expresión constitutivo.

Sin embargo, al parecer el grupo de los dos genes *BdCSOD* tendrían una mayor participación en los efectos de estrés oxidativo causados por Al que el gen *BdMSOD*, ya que además de presentar más transcritos en la raíz de los dos genotipos (ABR8 y ABR1), en la línea sensible (ABR1) hay más transcritos de *BdCSOD1* y *BdCSOD2* como consecuencia de un mayor estrés oxidativo al tener una mayor peroxidación lipídica y peróxido de hidrogeno. Sin embargo, esto no sucede en la línea tolerante (ABR8) que tiene una menor cantidad de transcritos y menor estrés oxidativo. Existen pocas publicaciones que relacionen la expresión de los genes que codifican enzimas de SOD por efecto del Al. Sin embargo, se han descrito cambios para otras enzimas antioxidantes por tratamientos con Al. Nuestros datos son similares a lo encontrado en maíz, especie en la que una línea sensible produjo altos niveles de ROS bajo estrés por Al, mientras que la línea tolerante produjo bajos niveles de ROS (Boscolo y col. 2003), habiéndose detectado una alta cantidad de expresión de los genes que codifican peroxidasas en la línea sensible y una menor expresión en los genotipos tolerantes (Mattiello y col. 2010). Por otro lado, en *Arabidopsis* sea detectado un aumento de la producción de ROS y un aumento de los transcritos de cuatro isoformas diferentes de SOD tras 48 hrs de exposición al estrés por Al, aunque en este caso, se detectaron más transcritos de peroxidasas y glutatión-S-transferasa (Kumari y col. 2008).

Los análisis transcriptómicos realizados con dos genotipos de maíz con distinto grado de tolerancia al estrés por Al, han demostrado que la línea tolerante tenía más transcritos de SOD que la sensible. Por otro lado, en la línea sensible se encontraron más transcritos que codifican para enzimas glutatión-S-transferasa (Maron y col. 2008). No obstante, estos estudios se hicieron a una concentración 39 µM de aluminio, mucho más alta que la utilizada en los



análisis de expresión en *Brachypodium* (20 μ M de Al). Además, la mayor cantidad de transcritos de SOD en maíz se detectó a 2 y 6 hrs, bajando considerablemente los niveles de expresión a 24 hrs. Sin embargo, en el trébol (*Lolium perenne*) se detectó a 8 hrs una mayor expresión de transcritos de *LpCSOD* en la línea sensible (Jumbo) que en la línea semi-tolerante (Nui), pero la expresión disminuyó hasta igualarse en los dos genotipos al cabo de 48 hrs (Cartes y col. 2012). Los genes que codifican enzimas de SOD se expresan muy pronto (8 hrs.), pero en nuestro estudio solamente hemos evaluado a 24 hrs, por lo cual, en el futuro se podría estudiar la expresión génica de *BdSOD* a tiempos más cortos en *Brachypodium*.

En cuanto a la mayor expresión de genes del grupo *BdCSOD* en la línea sensible, es posible que se deba a que los genes que codifican estas enzimas se encuentran localizados en más sitios celulares como el citosol, cloroplasto y espacio extracelular (Alscher y col. 2002), no así *BdMSOD*, cuya localización está limitada a la mitocondria y peroxisomas (Alscher y col. 2002). La localización subcelular y la mayor expresión de genes *BdCSOD* se asocia sobre todo a una mayor participación de estas enzimas en el citosol de las células de la línea sensible donde hay una mayor acumulación de Al en el citoplasma celular como en espacios extracelulares. Ya se había demostrado en líneas sensibles *Bd* y *Bh* que estas acumulan más aluminio en la raíz que las tolerantes, por lo tanto, las enzimas *BdCSOD* estarían participando activamente en la protección del daño oxidativo en la línea sensible *Bd* por efecto del Al.

Aunque hay más expresión de transcritos de *BdCSOD* en la línea sensible por el efecto del estrés por Al, también hemos detectado más transcritos en raíces sin tratar. Sin embargo, esto se contradice con nuestros estudios histoquímicos que detectan sólo mayor peroxidación en tratamientos con Al pero muy poca sin Al (Figura 19e, f). Creemos que los datos no se correlacionarían porque nuestras observaciones de las raíces con la tinción DCF-DA solamente se llevaron a cabo en la parte externa de la raíz y no en la parte interna. Por tanto, tal vez con cortes histológicos se pueda observar una mayor peroxidación o mayor intensidad de la tinción en las células internas de la línea sensibles. Otra posible explicación de los altos niveles de expresión de los genes *BdCSOD* en la línea sensible (ABR1) en los tratamientos sin Al, se debería a un estrés oxidativo abiótico debido al pH ácido de la solución nutritiva (toxicidad H^+) (Marschner 1991).

Por otro lado, el genotipo tolerante (ABR8) podría estar utilizando una combinación de mecanismos de tolerancia al estrés por Al, entre ellos la exudación de ácidos orgánicos, mecanismo que no tiene la línea sensible (ABR1) y, con ello, liberarse de los daños producidos por la toxicidad de Al, evitando indirectamente los daños oxidativos causados por ROS, daños que no parece poder evitar la línea sensible.

En futuros trabajos si se desea ampliar los estudios para relacionar los niveles de expresión génica con los procesos fisiológicos de estrés oxidativos causados por el Al en *Brachypodium*, sería necesario estudiar los niveles de expresión de otros genes que codifican enzimas como peroxidasas, catalasas y glutatión S-transferasa, y comparar líneas tolerantes y sensibles.

También sería interesante complementar los estudios de expresión génica con los de actividad de los sistemas enzimáticos correspondientes.

En resumen, los genes *BdCSOD1* y *BdCSOD2* pueden estar relacionados con la tolerancia al estrés por Al debido a que se expresan más en raíz que en hoja. Además, una mayor expresión de estos genes se correlaciona con un mayor estrés oxidativo.

5.6. Genes de *PME* y *XTHs*

La pared celular es el primer sitio de interacción del Al. En este trabajo hemos estudiado varios genes relacionados con la formación y extensión de la pared celular. En la línea tolerante ABR8 observamos, con la tinción rojo de rutenio, un aumento de la acumulación de pectinas en las raíces al tratar con Al, mientras que en la línea sensible el resultado fue contrario. A esto hay que sumar que las tolerantes (ABR8 y CB) acumulan muy poco Al mientras que las sensibles acumulan mucho Al (ABR1 y GRA788). Se ha demostrado en varias especies vegetales que en la pared celular se acumula la mayor parte del Al, observándose más en genotipos sensibles que tolerantes (Clarkson 1967, Taylor y col. 2000). En la raíz de la línea tolerante ABR8 se encontró más cantidad de transcritos de *BdPME* que en raíces de la línea sensible ABR1. Esta alta cantidad de transcritos observada en las plantas tolerantes podría redundar en una alta cantidad de proteínas PME. El Al podría activar las proteínas PME en el cultivar tolerante, metil-esterificando las pectinas de la pared celular en la línea tolerante y no en la sensible. Esto podría relacionarse con una menor acumulación de aluminio en la pared celular de la tolerante comparada con la sensible. Resultados similares se han observado en maíz y trigo (Eticha y col. 2005, Yang y col. 2008) ya que las variedades de maíz y trigo muestran un alto grado de metil-esterificación, entrando menos Al en las paredes celulares de las tolerantes.

El Al afecta a la pared celular, disminuyendo su extensibilidad. Se considera que las xiloglucan endotransglucosilasa hidrolasas (*XTHs*) están involucradas en la resistencia y extensibilidad de la pared celular (Rose y col. 2002). Por tal motivo, se han estudiado los cambios en la expresión de los ARN mensajeros de genes que codifican para estas enzimas.

Los cuatro genes (*BdXTH5*, *BdXTH14*, *BdXTH31* y *BdXTH15*) estudiados de la familia *XTH* tienen una expresión diferenciada en respuesta al estrés por Al, en genotipos tolerantes y sensibles. Nuestros datos confirman que tres genes (*BdXTH5*, *BdXTH14* y *BdXTH31*) parecen expresarse más en raíz que en hoja y sólo un gen (*BdXTH15*) se expresa más en hoja que en raíz. Al parecer la mayor cantidad de genes expresados en raíz podría sugerir que las proteínas codificadas por esos genes están cumpliendo funciones importantes en la pared celular.

En *Arabidopsis* se ha descrito una represión de tres genes *XTH* (*AtXTH15*, *AtXTH14* y *AtXTH31*) por causa del estrés por Al y sólo un gen (*AtXTH5*) tuvo una moderada inducción por el efecto del Al. La represión de la mayoría de los genes coincide temporalmente (a los 30 min de tratamiento con Al) con una mayor inhibición de la actividad de las XET (nomenclatura de las enzimas xiloglucan endotransglucosilasa hidrolasas). En este mismo trabajo, la mayor



acumulación de AI se detectó en las hemicelulosas, con una reducción de la actividad de la XET que posiblemente están involucradas en la inhibición del crecimiento de la raíz provocado por AI (Yang y col. 2011). Sin embargo, si la represión de los genes *XTH* se asocia a una menor actividad de las enzimas XET, en *Brachypodium* esta asociación no está clara, ya que si observamos los modelos de expresión de los genes *XTH* de las especies diploides, la mayoría de los genes no se reprimen en la línea sensible (ABR1), siendo algunos constitutivos (*BdXTH31*) y otros se inducen (*BdXTH14*). Inclusive en la línea tolerante ni si quiera se observa expresión del gen *BdXTH31* (habiéndose confirmado previamente que si hay amplificación con ADN genómico). En cuanto a las líneas alotetraploides se observan resultados similares a los modelos de expresión de las diploides. No ha sido posible diferenciar mediante RT-PCR semicuantitativa los niveles de expresión de cada genoma. A pesar de esto, sólo el gen *BdXTH5* tiene un modelo de expresión distinto entre tolerantes y sensibles, tanto en diploides como alotetraploides. Este gen en las raíces de las líneas sensibles se reprime y en las líneas tolerantes es constitutivo. Por tanto, nuestros resultados no permiten establecer una relación entre estos genes y la tolerancia en *Brachypodium*.

Muchos de los miembros de la familia XTHs muestran especificidad de órgano o tejido, varios XTH predominan en raíces, silicuas o nervios, respondiendo diferencialmente a las hormonas vegetales y muestran una regulación de expresión diferencial frente a auxinas, giberelinas, brasinólidos y ácido abscísico (Yokoyama y Nishitani, 2001, Xu y col. 1996; Akamatsu y col. 1999).

Hay que recordar además que los polisacáridos xiloglucanos son más abundantes en las paredes celulares de las dicotiledóneas que en las de Poaceae, sugiriendo en futuros trabajos de tolerancia al estrés por AI, estudiar otros compuestos de la pared celular como el *glucurono-arabinoxilanos (GAXs)*, que es uno de los principales polímeros de la pared celular de las Poaceae.

5.7 Análisis de la región codificante y de las secuencias que flanquean el gen *BdALMT1*, y los genes *BdMATE1* y *BdMATE2*.

Basándonos en los diferentes modelos de expresión de los genes *ALMT1* entre las raíces de líneas tolerantes y sensibles de las especies *Bd* y *Bh*, decidimos estudiar la región codificante de este gen en *B. distachyon*. Hemos secuenciado la región codificante de la línea sensible ABR1 y la línea tolerante ABR8, las cuales poseen cinco exones y cuatro intrones siendo estas muy similares entre sí, mostrando sólo diferencia en dos SNPs, uno en el exón 1 y otro en el exón 5. Estos cambios de SNPs dan lugar a cambios en dos aminoácidos, que según los programas de predicción de estructuras proteicas, probablemente no alterarían la estructura de la hipotética proteína y, probablemente no alterarían su función. Por otro lado, en cuanto a las especies alotetraploides hemos estudiado la región codificante del gen *BsALMT1* del genoma de *B. stacei* en la línea diploide *Bs* (E66). Los resultados reflejaron que las regiones codificantes y no codificantes de *Bs* son muy diferentes de las del gen *BdALMT1* de *Bd*. En la línea diploide *B. stacei* (E66) comparada con las dos líneas *B. distachyon* (ABR1 y ABR8) se



detectaron 54 SNPs y 2 Indel en los exones, muchos de ellos en el exón 1. Además, entre las proteínas hipotéticas de *Bd* y *Bs* se observaron 21 posiciones con aminoácidos diferentes y 17 aminoácidos adicionales en *Bs*.

En centeno, al igual que en *B. distachyon*, se observó una mayor cantidad de transcritos del gen *ALMT1* en las tolerantes que las sensibles y tampoco se han detectado grandes diferencias en los exones del gen *ScALMT1* entre el cultivar tolerante (Ailés) y la línea sensible (Riodeva), habiéndose observado un 98% de identidad nucleotídica y solo seis aminoácidos de diferencia, de los cuales cinco son sustituciones de aminoácidos con iguales o similares propiedades químicas (Fontecha y col. 2007). Collins y col. (2008) han encontrado cinco copias del gen *ScALMT1* formando un cluster en el genotipo tolerante y dos en el sensible. Sin embargo, Fontecha y col. (2007) han observado la situación opuesta, la línea sensible Riodeva presentaba alrededor de cinco copias mientras que la tolerante presentaba una copia. Por tanto, no es posible relacionar con claridad número de copias con tolerancia.

El gen *HvMATE1* controla la tolerancia al aluminio en cebada codificando una proteína implicada en el transporte de citrato. Un estudio, de 10 cultivares de cebada que difieren en su grado de tolerancia, no ha detectado variaciones importantes en la secuencia de nucleótidos (sólo 4 SNPs en el ORF) que den lugar a cambios en la estructura de la proteína HvMATE1. En estos cultivares de cebada se observa una buena correlación entre la expresión y la cantidad de citrato exudado por la raíz (Furukawa y col. 2007), y su explicación se debe a una variación en el promotor que se detallará más adelante.

En trigo al igual que en *B. distachyon* no se ha encontrado una gran variabilidad en la región codificante del gen de *ALMT1* entre tolerantes y sensibles, sin embargo, sí se ha encontrado variabilidad en la región promotora ("upstream"). En 34 líneas de trigo con distinto grado de tolerancia al estrés por Al se ha demostrado que la secuencia "upstream" del gen *TaALMT1* es considerablemente más variable que la región codificante (ORF). Los genotipos tolerantes, con un nivel de expresión más alto, presentan un mayor número de bloques repetitivos en la región "upstream", mientras que las líneas sensibles tienen una menor expresión y carecen de bloques repetitivos en la región "upstream" (Sasaki y col. 2006).

Aunque no hemos encontrado una gran variabilidad en la región codificante del gen *BdALMT1* entre una línea tolerante (ABR8) y sensible (ABR1), si hemos detectado una diferencia importante en la región promotora ("upstream") del gen entre líneas tolerantes y sensibles en las dos especies de *Brachypodium* (*Bd* y *Bh*). La presencia de una inserción en la región promotora sólo en las líneas tolerantes podría explicar la mayor expresión de transcritos del gen *BdALMT1*. Esta inserción está localizada a 1789 pb antes del triplete de inicio ATG. No ha sido posible amplificar esta inserción usando polimerasas específicas para grandes fragmentos. Por lo tanto, el tamaño de esta pieza es probablemente bastante grande. Además, en esta posición, en el promotor del gen *BdALMT1* en la línea diploide Bd21 (línea completamente secuenciada y que hemos clasificado como sensible) se han encontrado LTRs típicas de transposones, estando presente también estas LTRs en la línea sensible (ABR1).



Se ha descrito previamente en genotipos tolerantes de cebada y trigo, la inserción de un transposón en la región promotora de otros genes (*HvMATE1* y *TaMATE1*) de tolerancia al estrés por Al (Fujii y col. 2012, Tovkach y col. 2013). El transposón Sukula-like detectado en trigo (insertado en la región “upstream” a 25 pb desde el sitio ATG del gen *TaMATE1*) tiene un tamaño muy grande de 11,1 kb. Teniendo en cuenta este hallazgo y la existencia de LTRs en la zona de la inserción en *B. distachyon*, la inserción detectada en el promotor del gen *BdALMT1* podría ser un transposón de gran tamaño. Esta inserción sólo fue detectada en las líneas tolerantes de dos especies distintas, *Bd* y *Bh*, no la hemos observado en ninguna línea sensible. Hemos calculado la probabilidad de asociación entre ambos sucesos suponiendo que la presencia de la inserción y la tolerancia fueran sucesos independientes, usando un modelo de probabilidad hipergeométrica. La probabilidad de la asociación entre la inserción y la tolerancia al estrés por Al fue de un 1,6% en líneas diploides y $2,8 \times 10^{-9}\%$ en ecotipos alotetraploides, siendo ambos resultados significativos al 5%. Por tanto, existe una estrecha asociación entre la presencia de la inserción y la tolerancia que difícilmente puede explicarse por azar.

En el futuro, trataremos de conseguir la secuencia de la inserción en el promotor de *BdALMT1* y buscar motivos en la región promotora que probablemente regulen la expresión del gen. Además, trataremos de averiguar si existen más copias del gen *BdALMT1* en la línea tolerante ABR8 y en los ecotipos alotetraploides tolerantes y hacer un “knockout” del gen *BdALMT1* en ABR8 para anular su expresión y observar si realmente está involucrado en el transporte de malato y si dicho mutante pierde la tolerancia.

En cuanto a las secuencias analizadas que flanquean los genes *BdMATE1* y *BdMATE2*, prácticamente no se observaron diferencias entre líneas tolerantes y sensibles. Aunque la línea ABR8 exuda más cantidad de citrato que la línea sensible, nuestro estudio de las regiones “upstream” y “downstream” no mostró variación significativa que esté asociada a la mayor cantidad de transcritos en nuestra línea tolerante (ABR8). Hay que tener en cuenta que el tamaño analizado de las regiones que flanquean los genes es pequeño, siendo posible que las variaciones se encuentren más alejadas de la zona codificante. Otra posible explicación sería que un gen distinto de la familia *BdMATE* estuviera involucrado en la tolerancia en *Brachypodium*.

5.8. Variabilidad genética y relación entre la procedencia de suelos ácidos y la tolerancia al estrés por Al de las líneas de *B. distachyon*, *B. stacei* y *B. hybridum*

5.8.1. Variabilidad

La cuantificación de la variabilidad genética es crucial en los estudios de genética de poblaciones ya que nos indica el grado de erosión genética de las poblaciones y nos permite establecer relaciones filogenéticas.

5.8.1.1. SSR

Todas las muestras diploides de *Bd* analizadas con los 17 SSRs pentanucleótidos mostraron un solo pico en el electroforegrama, es decir lo esperado para una especie autógama en la que todos los individuos de la misma línea poseen el mismo genotipo homocigoto. Sin embargo, en las líneas de alotetraploides de *Bh* se detectaron varios loci de SSR con dos picos en el electroforegrama. Teniendo en cuenta que se trata de una especie autógama, con dos juegos cromosómicos, la interpretación más probable es que se trata de individuos homocigotos en dos loci distintos homeólogos. En estos casos, con dos picos en las líneas alotetraploides de *Bh*, es fácil distinguir, en la mayoría de las situaciones, el alelo procedente del parental *Bd* y el del parental *Bh*. Esta situación también se ha observado en otras muestras de *Bh* por Giraldo y col. (2012) y Vogel y col. (2009) asumiendo que no hay heterocigosidad en las poblaciones, salvo casos muy excepcionales.

Todas las líneas de *B. stacei* analizadas fueron idénticas y mostraron los mismos alelos, aunque solamente se obtuvieron amplificaciones claras con cinco de los 17 SSRs estudiados (Bd2GSSR_212, Bd4GSSR_399, Bd5GSSR_128, Bd1GSSR_174 y Bd4GSSR_272) (Figura 40). Estos resultados se explican teniendo en cuenta que los “primers” para las amplificaciones de los SSRs se han diseñado a partir de la secuencia del genoma de la línea Bd21 de *B. dystachyon*, por tanto, amplifican bien en esta especie pero son menos eficientes en *B. stacei*, lo que hace pensar que las regiones en las que han sido diseñados los “primers” de varios SSRs no están conservadas en ambos genomios.

El PIC promedio obtenido con cuatro SSRs (repeticiones de di- y trinucleótidos), en una muestra de 64 líneas diploides *Bd* procedentes de España, fue 0,53. El microsatélite ALB15 (dinucleótido), analizado previamente en muestras de Turquía, mostró un PIC superior en las muestras españolas (PIC= 0,867) que en las turcas (PIC=0,55) (Giraldo y col. 2012). En nuestro caso el PIC promedio de las líneas diploides *Bd* fue inferior (PIC=0,42). En 25 líneas (genotipos) de soja (especie autógama, como *Brachypodium*), mediante 12 SSRs el PIC osciló entre 0,13 y 0,88, y el promedio fue de 0,60 (Tantasawat y col. 2011). En 58 líneas de maíz el PIC promedio, estimado con 131 SSRs, fue 0,62; oscilando entre 0,06 y 0,91. De los 131 SSRs, 59 fueron repeticiones de dinucleótidos y presentaron el PIC más alto (0,70) mientras que los SSRs trinucleótidos y tetranucleótidos mostraron un PIC inferior (0,53). (Smith y col. 1997). El PIC promedio de nuestras líneas alotetraploides *Bh* (0,5) también fue inferior al observado en estos trabajos, aunque es superior al obtenido en las líneas *Bd*, probablemente debido a que las líneas alotetraploides poseen dos genomios diferentes.

Creemos que el bajo PIC observado en nuestras líneas de *Brachypodium* puede deberse probablemente a que nuestros SSRs son repeticiones de pentanucleótidos, ya que se ha observado que los SSR de repeticiones de di-, tri- y tetranucleótidos en *Brachypodium* muestran mayor variación que los de pentanucleótidos. Otra posible causa es haber seleccionado SSR pentanucleotidos con bajo número de repeticiones, ya que los SSRs con más repeticiones son más polimórficos que los SSRs con pocas repeticiones (Vogel y col. 2009). Los



SSRs con cinco repeticiones en *Brachypodium* presentan un promedio de 1,5 alelos por locus, mientras que los que poseen 13 o más repeticiones muestran 3,2 alelos por locus (Vogel y col. 2009). A pesar de esto, en nuestro caso, el número promedio de alelos por locus fue 3.

La línea tolerante diploide ABR8 de *Bd* tiene el mayor número de alelos exclusivos, cuatro; mientras que las restantes líneas diploides sensibles de *Bd* presentan como mucho un sólo alelo exclusivo (Guadalajara1, Segovia1 y Francia1). Los genotipos alotetraploides tolerantes de *Bh* tienen 12 alelos exclusivos, pero de ellos solamente siete están presentes en las 10 líneas tolerantes y ausentes en todas las líneas de *Bh* sensibles. La presencia de estos alelos exclusivos en los genotipos tolerantes probablemente esté relacionada con los procesos de adaptación a suelos ácidos. Además, la variabilidad detectada (número medio de alelos y PIC promedio) en las líneas alotetraploides tolerantes de *Bh* fue inferior al de las muestras sensibles, lo que indica que las muestras tolerantes se parecen más entre sí que a las líneas sensibles. Hecho que a su vez se observa en las relaciones filogenéticas obtenidas, en las que las líneas tolerantes de *Bh* se agrupan en un “cluster” distinto a las sensibles. Por tanto, estos resultados sugieren que las líneas tolerantes de *Bh* podrían tener un origen común.

En un estudio de diversidad con 187 muestras de *Brachypodium distachyon* procedentes de Turquía e Irak detectaron una gran variabilidad con 43 SSRs, observándose diferencias significativas asociadas al tamaño de la semilla, requerimientos de vernalización, arquitectura de la inflorescencia y presencia de vellosidades en la espiga (Vogel y col. 2009).

Los marcadores Bd1GSSR_186 y Bd3GSSR_357 mostraron el mayor número de alelos por locus (6 alelos) en la especie diploide *Bd*, mientras que en las alotetraploides *Bh* el mayor número de alelos por locus lo presentó Bd3GSSR_357 (5 alelos).

Cuatro de los 17 SSR estudiados permiten distinguir los tres citotipos o especies analizadas: *Bd* con $2x=10$, *Bs* con $2x=20$ y *Bh* con $4x=30$. De forma que todas las líneas de *Bh* presentan dos alelos que se distinguen mediante electroforesis capilar en equipos de secuenciación o dos productos de PCR de distinto tamaño mediante amplificación. Mientras que las líneas parentales de *Bd* y *Bs* solo presentan un alelo o producto de amplificación diferente cada una (Figura 40). En un trabajo previo llevado a cabo por Giraldo y col. (2012) con cuatro SSRs también distinguieron las tres especies de *Brachypodium*.

Además de los cuatro SSR que distinguen las tres especies de *Brachypodium*, hemos diseñado parejas de “primers” que amplifican un fragmento, que contiene parte de la región “upstream” y del exón 1 del gen *BdALMT1*, que presenta un INDEL que distingue entre las líneas diploides de las especies *Bd* y *Bs*. Las líneas de la especie alotetraploide *Bh* dan lugar a dos fragmentos con distinto tamaño y las parentales *Bd* y *Bs* originan uno solo fragmento pero de distinto tamaño. Estas parejas de “primers” también se han empleado para corroborar la constitución cromosómica diploide o alotetraploide de las líneas estudiadas y la pertenencia a una de las tres especies.

5.8.1.2. ISSR

El PIC promedio con los siete “primers” de ISSR es más alto en la especie alotetraploide *Bh* (PIC=0,32) que en la especie diploide *Bd* (PIC=0,22). Esta diferencia a favor de las líneas alotetraploides podría explicarse teniendo en cuenta que poseen dos genomioms distintos. El porcentaje de bandas polimórficas en las alotetraploides de *Bh* fue de 98,6% y en las diploides de *Bd* fue de 93,1%, siendo más alto el de las alotetraploides que el de las diploides.

El nivel de polimorfismo que hemos encontrado en *Bd* y *Bh* fue superior al estimado en otras especies de Poaceas como cebada con un 83% (Fernández y col. 2002) y centeno con un 76,2% entre diferentes especies del género *Secale* (Santos y col. com. per.) y 82% entre cultivares de *Secale cereale* (Matos y col. 2001). En centeno los análisis de ISSRs se realizaron mezclando el DNA de distintos individuos del mismo cultivar para constituir un bloque y detectar variabilidad entre cultivares distintos. Inclusive, el porcentaje de bandas polimórficas detectado con los ISSR en nuestra colección de líneas de las especies *Bd* y *Bh* es más alto que el obtenido con otros marcadores, como los RAPDs en cebada (Fernández y col. 2002, Matos y col. 2001). Por lo tanto, los marcadores ISSR son un sistema eficiente que detecta niveles altos de polimorfismo en *Brachypodium*. Una posible explicación para el elevado nivel de polimorfismo detectado en nuestro trabajo con *Brachypodium* puede ser la técnica de electroforesis capilar empleada por el equipo de QIAxcel (Qiagen) para separar los fragmentos. Esta técnica permite distinguir con mayor precisión entre tamaños de fragmentos parecidos que la electroforesis en geles de agarosa. En *Vigna umbellata* se ha calculado un PIC de 0,203 con 37 marcadores ISSR en una colección de 10 poblaciones. Además, obtuvieron un 61,79% de bandas polimórficas con los ISSR (Muthusamy y col. 2008). Estos valores son inferiores a los detectados en *Brachypodium*. En *Jatropha curcas* el PIC promedio obtenido con siete “primers” de ISSRs fue de 0,26 y el porcentaje de bandas polimórficas fue del 92% en una colección de 332 muestras procedentes de Brazil (Grativol y col. 2010). Sin embargo, en *Jatropha* las estimaciones son más semejantes a las obtenidas en *Brachypodium*.

Por otro lado, se ha detectado un menor PIC promedio en las 10 líneas alotetraploides tolerantes de *Bh* (0,16) que en las 27 líneas sensibles (0,24). Dicho resultado, indica una menor variabilidad en las muestras alotetraploides tolerantes que en las sensibles y, probablemente, implica que las tolerantes se parecen más entre sí, apoyando este dato, los resultados de los análisis filogenéticos.

Al igual que los marcadores SSR, con los ISSR también encontramos bandas exclusivas en los genotipos tolerantes y en los sensibles. Hemos encontrado siete bandas exclusivas, presentes en las 10 líneas alotetraploides tolerantes que están ausentes en las líneas sensibles. También, hay tres bandas exclusivas en la línea diploide ABR8 no observadas en el resto de las líneas diploides sensibles. El cebador 844 muestra un perfil de amplificación que distingue de forma clara los genotipos tolerantes de los sensibles, tanto en diploides como alotetraploides. Varios trabajos han encontrado marcadores que identifican plantas tolerantes a un determinado tipo de estrés abiótico pero que proceden de genes candidato o de loci ligados a genes de



tolerancia al estrés (Cheprot y col. 2013, Kaçar y col. 2014). En nuestro caso, además de la inserción en el promotor del gen candidato de tolerancia *BdALMT1* presente sólo en los genotipos tolerantes alotetraploides y diploides, también hemos detectado alelos de SSR e ISSRs procedentes de distintas regiones del genoma que son exclusivos de líneas tolerantes, aunque no existe ninguno que sea exclusivo y compartido por todas las tolerantes alotetraploides y la única línea diploide tolerante.

5.8.2. Relaciones filogenéticas

Las relaciones filogenéticas encontradas en un trabajo con 187 líneas de *Brachypodium distachyon* de Turquía e Irak (Vogel y col. 2009) pusieron de manifiesto la existencia de dos grupos (“clustres”). Un grupo pequeño con líneas Tek que comparten varios rasgos fenotípicos como requerimientos de vernalización larga, tamaño de la semilla y ausencia de vellosidades en el lema, y otro grupo (“clustrer”) más grande con líneas procedentes de Turquía e Irak que poseen una alta semejanza fenotípica. El trabajo concluye que la alta diversidad de genotipos homocigotos encontrados en pequeñas áreas sugiere una gran dispersión de las semillas.

En otro estudio de relaciones filogenéticas con marcadores SSRs de una colección de *Brachypodium* de la Península Ibérica se obtuvieron tres grupos (“clusters”) principales, uno para cada una de las especies de *Brachypodium*: *Bd*, *Bs* y *Bh*. Sin embargo, mediante ISSRs se observaron también tres grupos, pero en cada uno había mezclas de muestras de diferentes especies de *Brachypodium* (Hammami y col. 2014).

Nuestros resultados de relaciones filogenéticas muestran que, tanto con los microsatélites (SSRs) como con los inter-microsatélites (ISSRs), las líneas diploides de *Bd* se separan de las líneas alotetraploides de *Bh* encontrándose en grupos o “clusters” distintos. Además, la línea diploide *Bd* ABR8 tolerante queda separada del resto de las líneas diploides de *Bd* sensibles. Las líneas diploides de *Bd* procedentes de Turquía e Iraq se separan en un subgrupo o “subcluster” del resto de líneas, en su mayoría procedentes de la Península Ibérica. Por otro lado, las diez líneas tolerantes alotetraploides de *Bh* se encuentran en un subgrupo (“subcluster”) separado del resto de las líneas alotetraploides de *Bh* sensibles.

En algunos casos, líneas de diferentes procedencias u orígenes geográficos aparecen juntas en un mismo grupo (“cluster”). Esta situación se ha observado en *Brachypodium* en los trabajos de Vogel y col. (2009). Nosotros también hemos observado situaciones semejantes, por ejemplo, dos líneas Españolas (de Valencia y Jaén), una de Turquía, otra de Ucrania y una de Croacia juntas en un grupo (“cluster”). En regiones u áreas geográficas pequeñas de la Península Ibérica es posible encontrar diferentes genotipos homocigotos en *Brachypodium*, observándose variabilidad intrapoblacional (Giraldo y col. 2012, Hammani y col. 2014).

Hasta ahora no hay ninguna publicación de análisis de relaciones filogenéticas en genotipos con distinto grado de tolerancia al estrés por Al en *Brachypodium*. Un análisis de relaciones filogenéticas con 89 líneas de sorgo con diferentes grado de tolerancia, basado en fragmentos

procedentes del locus *ALT_{SB}*, encontró que tres líneas tolerantes de sorgo formaban un “cluster” separado de las otras líneas sensibles (Cheprot y col. 2013). Por otro lado, en *Citrus* han observado variabilidad genética entre genotipos que muestran distinto grado de tolerancia al estrés por deficiencia de Fe (Kaçar y col. 2014). A partir de dos genes candidatos de tolerancia a la clorosis férrica, encontraron que de 25 genotipos, los trifoliados, que son más sensibles a la deficiencia por Fe, formaron un solo “cluster”, mientras que los genotipos tolerantes se separaron formando otro “cluster” (Kaçar y col. 2014). En estas publicaciones los estudios de relaciones filogenéticas están realizados con regiones determinadas del genoma que confieren algún grado de tolerancia a un determinado tipo de estrés. Sin embargo, nuestros estudios de relaciones filogenéticas en *Brachypodium* no están realizados con fragmentos o regiones de genes relacionados con la tolerancia al estrés por Al. En nuestro caso hemos analizado marcadores microsatélites (SSRs) distribuidos en los cinco cromosomas y en diferentes regiones (centroméricas y teloméricas) e inter-microsatélites (ISSRs) que proceden de diferentes regiones del genoma. Nuestros resultados indican que los ecotipos o líneas procedentes de suelos ácidos han sufrido probablemente una adaptación a dicho ambiente y, como consecuencia, comparten secuencias y/o cambios que los hacen más parecidos entre si y diferentes de aquellas líneas o ecotipos que proceden de suelos de tipo alcalino. Es importante hacer notar que tanto con SSRs como con ISSRs se han detectado alelos o fragmentos exclusivos de las líneas y ecotipos tolerantes en ambas especies (*Bd* y *Bh*).

Aunque la tolerancia al estrés por Al es más frecuente en plantas alotetraploides que en plantas diploides de *Brachypodium*, el grado de ploidía no es el único factor a tener en cuenta en la tolerancia en *Bh*. Probablemente, existen otros factores importantes como la adaptación a condiciones de suelo ácido. De los 37 ecotipos tetraploides analizados, 36 proceden de España y uno de Irán (GRA788). De estos, 27 ecotipos fueron sensibles al estrés por Al y 10 ecotipos alotetraploides fueron tolerantes. Todos los ecotipos tolerantes proceden de regiones de suelos ácidos de España, mientras que el resto proviene de suelos de tipo alcalino. Por otro lado, sabemos que la única línea tolerante diploide (ABR8) proviene de suelos ácidos de la región de Siena (Italia) y la mayoría de las líneas diploides de Turquía y de España proceden de suelos alcalinos y son todas sensibles. Esta circunstancia también ha sido observada en trigo, donde varios genotipos tolerantes provienen de regiones con suelos ácidos de Brazil y Portugal (Delhaize y col. 2012). También, en muestras de *Brachypodium* diploides y alotetraploides de la Península Ibérica, se ha relacionado la poliploidía con la adaptación al estrés por sequía (Manzaneda y col. 2012).

Curiosamente, en cebada, los cultivares tolerantes provienen de suelos ácidos de Japón, China y Corea y tienen una inserción de 1 kb detectada en la región “upstream” del gen *HVMATE1* (Fujii y col. 2012). De forma semejante, los genotipos tolerantes con tres copias del gen *ZmMATE1* sólo se encontraron en tres cultivares tolerantes de maíz, que comparten el mismo origen geográfico, en regiones de suelos ácidos de los trópicos de América del Sur (Maron y col. 2013). La diferencia en el número de elementos que actúan en cis en *Holcus lanatus*, según Chen y col. (2013) parece ser el resultado de la selección de los distintos alelos en terrenos



ácidos. Ryan y col. (2010) sugieren que el mecanismo de regulación de la expresión génica se ha desarrollado como resultado de la adaptación a suelos ácidos durante un plazo relativamente corto.

Por tanto, Las relaciones filogenéticas obtenidas en *Brachypodium* apoyan un origen común para las líneas alotetraploides tolerantes, ya que comparten una serie de características, marcadores moleculares y procedencia de suelos ácidos que sugieren un origen relacionado con procesos de adaptación a dichos suelos.

VII. CONCLUSIÓN



CONCLUSIONES

1. Las especies *Brachypodium distachyon*, *Brachypodium stacei* y *Brachypodium hybridum* son sensibles al estrés por Al comparadas con otras especies de Poáceas. Su grado de tolerancia es similar al de *Triticum aestivum*.
2. Los métodos convencionales de recrecimiento de la raíz después del tratamiento con Al han permitido detectar variabilidad, líneas tolerantes y sensibles, en *Brachypodium*. Las tinciones histoquímicas además de servir para evaluar el grado de tolerancia indican que las líneas sensibles acumulan más Al, muestran mayor peroxidación lipídica, producen mayor cantidad de H₂O₂ y presentan una mayor muerte celular que las tolerantes.
3. Hemos puesto a punto un sistema, barato y rápido, que sin necesidad de tinción o tratamiento histoquímico alguno de las raíces, permite clasificar las líneas de *Brachypodium* como tolerantes o sensibles.
4. Los genotipos tolerantes de *Brachypodium distachyon* y *Brachypodium hybridum* tienen un mecanismo de tolerancia basado en la exclusión del Al mediante la exudación de málico y cítrico.
5. La mayor expresión de los ARNm de los genes *BdALMT1*, *BdMATE1* y *BdMATE2*, que codifican proteínas transportadoras de ácidos orgánicos, en los genotipos tolerantes que en los sensibles, los convierte en buenos candidatos de tolerancia al estrés por Al en *Brachypodium*, aunque no se induzcan.
6. La expresión del gen *BdSTOP1*, que probablemente codifica para un factor de transcripción involucrado en la regulación de los genes *ALMT* y *MATE*, no cambia por el estrés con Al en *Brachypodium distachyon*, mostrando un modelo de expresión constitutivo en genotipos tolerantes y sensibles.
7. El estrés por el Al reprime la expresión de los genes para enzimas mitocondriales *BdMDH1*, *BdMDH2*, *BdCS* y *BdFH* involucrados en el metabolismo de los ácidos orgánicos, tanto en genotipos tolerantes como sensibles. La represión de algunas de estos genes podría explicar en parte la exudación de ácidos orgánicos.
8. Los cambios de expresión de los genes *BdCSOD1* y *BdCSOD2* de superóxido dismutasa implicados en el estrés oxidativo en los genotipos sensibles de *Brachypodium*, sugiere que pueden estar relacionados con la tolerancia.



9. La mayor cantidad de ARNm del gen *BdPME* probablemente juega un papel importante en el mecanismo de resistencia al estrés por Al en el genotipo tolerante de *Brachypodium distachyon*, ya que está asociada a una mayor cantidad de pectinas y una menor acumulación de Al en la pared celular de la raíz.
10. La expresión de los genes *BdXTH*, implicados probablemente en la formación de la pared celular, cambia por estrés con Al y es diferente entre genotipos tolerantes y sensibles, pudiendo ser candidatos a estar relacionados con la tolerancia en *Brachypodium*.
11. Todas las líneas tolerantes poseen una inserción en la región promotora del gen *BdALMT1* que está ausente en las sensibles. Esta diferencia podría explicar la mayor cantidad o mayor expresión del ARNm de este gen en los genotipos tolerantes. Por este motivo, el gen *BdALMT1* es un gran candidato para estar implicado en la tolerancia al estrés por Al en *Brachypodium*.
12. La variabilidad genética detectada con SSRs e ISSRs es mayor en las líneas alotetraploides de *B. hybridum* que en las diploides de *B. distachyon*. Sin embargo, los genotipos tolerantes de *B. hybridum* muestran una menor variabilidad genética que los sensibles de la misma especie.
13. Las relaciones filogenéticas obtenidas con SSRs e ISSRs indican que las líneas tolerantes de *B. hybridum* están agrupadas en un “cluster” distinto al de las líneas sensibles. La línea diploide tolerante ABR8 también está separada del “cluster” formado por el resto de líneas diploides sensibles de *B. distachyon*. También se observa relación con el origen geográfico.
14. Todos los genotipos tolerantes de *B. hybridum* y el único tolerante de *B. distachyon* proceden de suelos ácidos. Este hecho, junto con las relaciones filogenéticas obtenidas y la existencia de alelos exclusivos de SSRs y fragmentos de ISSRs exclusivos de las líneas tolerantes, indica que probablemente los genotipos tolerantes son el resultado de procesos de adaptación a suelos ácidos.

VIII. BIBLIOGRAFÍA



- Adams F. (1984). Crop response to lime in the southern United States In: Soil acidity and liming Adams, F (ed). American Society of Agronomy Inc. Madison WI. 211-265 pp.
- Abd El-Moneim D, Contreras R, Silva-Navas J, Gallego FJ, Figueiras AM and Benito C. (2014a). Pectin methylesterase gene and aluminum tolerance in *Secale cereal*. Environmental and Experimental Botany (Article *in press*).
- Abd El Moneim D, Contreras R, Silva Navas J, Gallego FJ, Figueira AM and Benito C. (2014b). On the consequences of aluminum stress in rye: repression of two mitochondrial malate dehydrogenase mRNAs. Plant Biology (Article *in press*).
- Achary VMM, Jena S, Panda KK and Panda BB. (2008). Aluminium induced oxidative stress and DNA damage in root cells of *Allium cepa* L. Ecotoxicol Environ Saf 70:300-310.
- Akamatsu T, Hanzawa Y, Ohtake Y, Takahashi T, Nishitani K and Komeda Y. (1999). Expression of endoxyloglucan transferase genes in acaulis mutants of *Arabidopsis*. Plant Physiol 121:715-722
- Almeida LAV. (1955). A material orgânica e a calagem na fertilização da terra. Boletim Ordem Engenheiros 4:1-16.
- Alscher RG, Erturk N, Heath LS. (2002). Role of superoxide dismutases (SODs). in controlling oxidative stress in plants. J Exp Bot 53:1331-1341.
- Allwood JW, Ellis DI, Heald JK, Goodacre R and Mur LAJ. (2006). Metabolomic approaches reveal that phosphatidic and phosphatidyl glycerol phospholipids are major discriminatory non-polar metabolites in responses by *Brachypodium distachyon* to challenge by *Magnaporthe grisea*. Plant Journal 46:351-368.
- Anderson NP, Hart JM, Sullivan DM, Christensen NW, Horneck DA and Pirelli GJ. (2013). Applying Lime to Raise Soil pH for Crop Production (Western Oregon). Oregon State University Extension Service EM 9057.
- Aniol A. (1984). Introduction of aluminum tolerance into aluminum sensitive wheat cultivars. Z Pflanzenzuchtg 93:331-339.
- Aniol A and Gustafson JP. (1984). Chromosome location of genes controlling aluminum tolerance in wheat, rye, and triticale. Can J Genet Cytol 26:701-705.
- Aniol A, Hill RD, Larter EN. (1980). Aluminum tolerance of spring rye inbred lines. Crop Sci 20:205-208.
- Aniol A. (1990). Genetics of tolerance to aluminium in wheat (*Triticum aestivum* L Thell). Plant and Soil 123:223-227.
- Aniol A and Madej L. (1996). Genetic variation for aluminum tolerance in rye. Votr Pflanzenz, chtg 35:201-211.
- Anoop VM, Basu U, McCammon MT, McAlister-Henn L, Taylor GJ. (2003). Modulation of citrate metabolism alters aluminum tolerance in yeast and transgenic canola overexpressing mitochondrial citrate synthase. Plant Physiol 132:2205-2217.



- Antosiewicz DM, Purugganan MM, Polisensky DH and Braam J. (1997). Cellular localization of *Arabidopsis* xyloglucan endotransglycosylase-related proteins during development and after wind stimulation. *Plant Physiol* 115:1319-1328.
- Bacic A, Fincher GB, Stone BA. (2009). *Chemistry, Biochemistry and Biology of (1-3)-β-Glucans and Related Polysaccharides*. Imprint Academic Press 350 pages. ISBN 978-0-12-373971-1.
- Baier AC, Somers DJ, Gustafson JP. (1995). Aluminum tolerance in wheat: Correlating hydroponic evaluation with field and soil performances. *Plant Breeding* 114:291-296.
- Bajic VB, Seah SH, Chong A, Zhang G, Koh JLY and Brusic V. (2002). Dragon Promoter Finder: recognition of vertebrate RNA Polymerase II promoters. *Bioinformatics* 18:198-199.
- Balestrieri C, Castaldo D, Giovane A, Quagliuolo L and Servillo L. (1990). A glycoprotein inhibitor of pectin methylesterase in Kiwi fruit (*Actinidia chinensis*). *European Journal of Biochemistry* 193:183-187.
- Basu A, Basu U, Taylor GJ. (1994). Induction of microsomal membrane proteins in roots of an aluminum-resistant cultivar of *Triticum aestivum* under conditions of aluminum stress. *Plant Physiol* 104:1007-1013.
- Begum HH, Mitsuru O, Toshihiro W, Takuro S. (2009). Mechanisms of Aluminum Tolerance in Phosphoenolpyruvate Carboxylase Transgenic Rice. *Journal of Plant Nutrition* 32(1):84-96.
- Bennet RJ, Breen CM and Fey MV. (1986). Aluminium toxicity and induced nutrient disorders involving the uptake and transport of P, K, Ca and Mg in *Zea mays* L South African. *Journal of Plant and Soil* 3(1):11-17.
- Brenchley R, Spannagl M, Pfeifer M, Barker GL, D'Amore R, et al. (2012). Analysis of the bread wheat genome using whole-genome shotgun sequencing. *Nature* 491:705-710. doi: 101038/nature11650.
- Binkley D, Driscoll CT, Allen HL, Schoeneberger P and McAvoy D. (1989). *Acidic deposition and forest soils: Context and case studies of the southeastern United States* New York. Springer Ecological studies 72.
- Boden SA, Kavanova M, Finnegan J and Wigge PA. (2013). Thermal stress effects on grain yield in *Brachypodium distachyon* occur via H2AZ-nucleosomes. *Genome Biology* 14(6):R65.
- Bogouszewski W. (1980). Plant adaptation to acid, aluminium-toxic soils. *Communications in Soil Science and Plant Analysis* 19(7-12):959-987.
- Borrero JC, Pandey S, Ceballos H, Magnavaca R, Bahia AFC. (1995). Genetic variances for tolerance to soil acidity in a tropical maize population. *Maydica* 40(3):283-288.
- Boscolo RS, Menossi M and Jorge RA. (2003). Aluminum-induced oxidative stress in maize. *Phytochemistry* 62:181-189.
- Bossolini E, Wicker T, Knobel PA, Keller B. (2007). Comparison of orthologous loci from small grass genomes *Brachypodium* and rice: implications for wheat genomics and grass genome annotation. *Plant J* 49:704-717.



- Bot AJ, Nachtergaele FO, Young A. (2000). Land resource potential and constraints at regional and country level FAO Land and Water Development Division, FAO, Rome.
- Bourlaug NE and Dowsell CR. (1997). The acid lands: One of agriculture's last frontiers In: Plant-Soil Interactions at Low pH Brazilian. Soil Science Society 5-15.
- Brkljacic J, Grotewold E, Scholl R, et al. (2011). *Brachypodium* as a model for the grasses: today and the future. Plant Physiology 157:3-13.
- Brochmann C, Brysting AK, Alsos IG, Borgen L, Grundt HH, Scheen AC and Elven R.. (2004). Polyploidy in arctic plants Biological Journal of the Linnean Society 82: 521-536
- Brunner I and Sperisen C. (2013). Aluminum exclusion and aluminum tolerance in woody plants. Front Plant Sci 4:172.
- Caffall KH and Mohnen D. (2009). The structure, function, and biosynthesis of plant cell wall pectic polysaccharides. Carbohydr Res 344:1879-1900.
- Cai MZ, Zhang SN, Xing CH, Wang FM, Wang N, Zhu L. (2011). Developmental characteristics and aluminum resistance of root border cells in rice seedlings. Plant Science 180:702-708.
- Campbell P and Braam J. (1998). Co-and/or post-translational modifications are critical for TCH4 XET activity. Plant J 15:553-561.
- Cançado GMA, Loguercio LL, Martins PR, Perentoni SN, Paiva E, Borém and Lopes MA. (1999). Hematoxylin staining as a phenotypic index for aluminum tolerance selection in tropical maize. (*Zea mays* L). Theor Appl Genet 99: 747-754
- Carpita NC and Gibeault DM. (1993). Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. Plant J 3:1-30.
- Cartes P, McManus M, Wulff-Zottele C, Leung S, Gutiérrez-Moraga A and Mora ML. (2012). Differential superoxide dismutase expression in ryegrass cultivars in response to short term aluminium stress. Plant Soil 350:353-363.
- Carver BF and Ownby JD. (1995). Acid Soil Tolerance in Wheat. Advances in Agronomy 54:117-173.
- Carver BF, Inskeep WP, Wilson NP, Westerman RL. (1988). Seedling tolerance to aluminum toxicity in hard red winter wheat germplasm. Crop Sci 28:463-467.
- Catala C, Rose JK y Bennett AB. (2000). Auxin-regulated genes encoding cell wall-modifying proteins are expressed during early tomato fruit growth. Plant Physiol 122:527-534.
- Catalán P, Shi Y, Armstrong L, Draper J, Stace CA. (1995). Molecular phylogeny of the grass genus *Brachypodium* P-Beauv based on RFLP and RAPD analysis. Bot J Linnean Soc 117:263-280.
- Catalán P and Olmstead RG. (2000). Phylogenetic reconstruction of the genus *Brachypodium* P-Beauv. (Poaceae). from combined sequences of chloroplast *ndhF* gene and nuclear ITS. Plant System Evol 220:1-19.



- Catalán P, Muller J, Hasterok R, Jenkins G, Mur LA, et al. (2012). Evolution and taxonomic split of the model grass *Brachypodium distachyon*. *Ann Bot* 109:385-405.
- Catalán P, Kellogg EA, Olmstead RG. (1997). Phylogeny of Poaceae subfamily Pooideae based on chloroplast ndhF gene sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 8:150-166.
- Chang YC, Yamamoto Y, Matsumoto H. (1999). Accumulation of aluminium in the cell wall pectin in cultured tobacco. (*Nicotiana tabacum* L). cells treated with a combination of aluminium and iron. *Plant Cell Environ* 22:1009-1017.
- Chakraborty R and L Jin. (1993). A unified approach to study hypervariable polymorphisms: statistical considerations of determining relatedness and population distances Pp 153-175 in S D J Pena, R Chakraborty, J T Epplen, and A J Freys, eds DNA fingerprinting: state of the science Birkhauser, Basel.
- Chen LS, Tang N, Jiang HX, Yang LT, Li Q and Smith BR. (2009). Changes in organic acid metabolism differ between roots and leaves of *Citrus grandis* in response to phosphorus and aluminum interactions. *Journal of Plant Physiology* 166(18):2023-2034.
- Chen ZC, Yamaji N, Motoyama R, Nagamura Y, Ma JF. (2012). Up-regulation of a magnesium transporter gene OsMGT1 is required for conferring aluminum tolerance in rice. *Plant Physiol* 159:1624-1633.
- Chen ZC, Yokosho K, Kashino M, Zhao FJ, Yamaji N, Ma JF. (2013). Adaptation to acidic soil is achieved by increased cis-acting element numbers regulating *ALMT1* expression in *Holcus lanatus*. *Plant J* 76:10-23.
- Cheprot RK, Matonyei TK, Were BA, Dangasuk OG, Onkware AO, Ouma, EO, Too EJ, Liu J, Gudu S and Kochian LV. (2013). Phylogenetic relationship among Kenyan sorghum germplasms based on aluminium tolerance. *African Journal of Biotechnology* 12(22):3528-3536.
- Chochois V, Vogel JP and Watt M. (2012). Application of *Brachypodium* to the genetic improvement of wheat roots. *J ExpBot* 63:3467-3474.
- Christensen U, Alonso-Simon A, Scheller HV, Willats WGT, Harholt J. (2010). Characterization of the primary cell walls of seedlings of *Brachypodium distachyon*, a potential model plant for temperate grasses. *Phytochemistry* 71:62-69.
- Claros MG and G von Heijne. (1994). An Improved Software For Membrane Protein Structure Predictions. *CABIOS* 10:685-686.
- Clarkson DT. (1967). Interactions between aluminum and phosphorus on root surfaces and cell wall material. *Plant Soil* 27:347-356.
- Collins NC, Shirley NJ, Saeed M, Pallotta M, Gustafson JP. (2008). An *ALMT1* gene cluster controlling aluminum tolerance at the *Alt4* locus of rye (*Secale cereale* L). *Genetics* 179:669-692.
- Cosgrove DJ. (2005). Growth of the plant cell wall. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6:850-861.
- Coutinho PM. (2003). Why are there so many carbohydrate-active enzyme-related genes in plants?. *Trends Plant Sci* 8:563-565.



- Cserzo M, F Eisenhaber, B Eisenhaber and I Simon. (2002). on filtering false positive transmembrane protein predictions. *Protein Eng* 15:745-752.
- Dalmaís M, Antelme S, Ho-Yue-Kuang S, Wang Y, Darracq O, et al. (2013). A TILLING Platform for Functional Genomics in *Brachypodium distachyon*. *PLoS ONE* 8(6):e65503.
- Darkó E, Ambrusa H, Stefanovits-Bányai E, Fodor J, Bakos F, Barnabás B. (2004). Aluminium toxicity, Al tolerance and oxidative stress in an Al-sensitive wheat genotype and in Al-tolerant lines developed by in vitro microspore selection. *Plant Sci* 163:583-591.
- De la Fuente JM, Ramírez-Rodríguez V, Cabrera-Ponce JL, Herrera-Estrella L. (1997). Aluminum tolerance in transgenic plants by alteration of citrate synthesis. *Science* 276:1566-1568.
- Degenhardt J, Larsen PB, Howell SH and Kochian LV. (1998). Aluminum resistance in the *Arabidopsis* mutant alr-104 is caused by an aluminum-induced increase in rhizosphere pH. *Plant Physiol* 117:19-27.
- Delhaize E, Hebb DM and Ryan PR. (2001). Expression of a *Pseudomonas aeruginosa* citrate synthase gene in tobacco is not associated with either enhanced citrate accumulation or efflux. *Plant Physiology* 125(4):2059-2067.
- Delhaize E, Ryan PR, Hebb DM, Yamamoto Y, Sasaki T and Matsumoto H. (2004). Engineering high-level aluminum tolerance in barley with the ALMT1 gene. *Proc Nat Acad Sci USA* 101(42):15249-15254.
- Delhaize E, Ryan P and Randall PJ. (1993). Aluminum tolerance in wheat. (*Triticum aestivum* L). II Aluminum stimulated excretion of malic acid from root apices. *Plant Physiol* 103:695-702.
- Delhaize E, Higgins TJV, Randall PJ. (1991). Aluminum tolerance in wheat: Analysis of polypeptides in the root apices of tolerant and sensitive genotypes. *Kluwer Academic Publishers* 45:1071-1079.
- Delhaize E and Ryan PR. (1995). Aluminum Toxicity and Tolerance in Plants. *Plant physiology* 107:315-321.
- Delhaize E, Taylor P, Hocking PJ, Simpson RJ, Ryan PR, Richardson AE. (2009). Transgenic barley (*Hordeum vulgare* L) expressing the wheat aluminium resistance gene (TaALMT1) shows enhanced phosphorus nutrition and grain production when grown on an acid soil. *Plant Biotechnology Journal* 7:391-400.
- Delhaize E, Ma JF and Ryan PR. (2012). Transcriptional regulation of aluminium tolerance genes. *Trends in plant science* 17:341-348.
- Demircan T, Akkaya MS. (2010). Virus induced gene silencing in *Brachypodium distachyon*, a model organism for cereals. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 100:91-96.
- Deng W, Luo K, Li Z, Yang Y, Hu N, and Wu Y. (2009). Overexpression of c mitochondrial citrate synthase gene in *Nicotiana benthamiana* confers aluminum tolerance. *Planta* 230(2):355-365.
- Devi SR, Yamamoto Y and Matsumoto H. (2003). An intracellular mechanism of aluminum tolerance associated with high antioxidant status in cultured tobacco cells. *J Inorg Biochem* 97(1):59-68.
- Dharmendra S, Singh NP, Chauhan SK, Phundan S. (2011). Developing aluminium-tolerant crop plants using biotechnological tools. *Curr Sci* 100:1807-1814.



- Donini P and Bryan GJ. (1998). The potential of microsatellite for high throughput genetic diversity assessment in wheat and barley. *Genetic resources and Crop evolution* 45:415-421.
- Douché T, San Clemente H, Burlat V, Roujol D, Valot B, Zivy M, Pont-Lezica R, Jamet E. (2013). *Brachypodium distachyon* as a model plant toward improved biofuel crops: Search for secreted proteins involved in biogenesis and disassembly of cell wall polymers. *Proteomics* 16:2438-2454.
- Doyle JJ and Doyle JL. (1990). Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12:13-15.
- Drader T, Kleinhofs A. (2010). A synteny map and disease resistance gene comparison between barley and the model monocot *Brachypodium distachyon*. *Genome* 53:406-417.
- Draper J, Mur LAJ, Jenkins G, Ghosh-Biswas GC, Bablak P, Hasterok R, Routledge APM. (2001). *Brachypodium distachyon*: a new model system for functional genomics in grasses. *Plant Physiol* 127:1539-1555.
- Efraín Ramírez-Benítez J, Chee-González L, Teresa Hernández-Sotomayor SM. (2008). Aluminium induces changes in organic acids metabolism in *Coffea arabica* suspension cells with differential Al-tolerance. *Journal of Inorganic Biochemistry* 102:1631-1637.
- Emel S. (2010). Evaluation of ISSR markers to assess genetic variability and relationship among winter triticale (x triticosecale witimack) cultivars. *Pak J Bot* 42(4): 2755-2763.
- Ermolayev V, Weschke W, Manteuffel R. (2003). Comparison of Al-induced gene expression in sensitive and tolerant soybean cultivars. *Journal of Experimental Botany* 54:2745-2756.
- Eticha D, Stass A and Horst WJ. (2005). Cell-wall pectin and its degree of methylation in the maize root-apex: significance for genotypic differences in aluminium resistance. *Plant, Cell & Environment* 28:1410-1420.
- Famoso A, Clark R, Shaff J, Craft E, McCouch S and Kochian L. (2010). Development of a novel aluminum tolerance phenotyping platform used for comparisons of cereal aluminum tolerance and investigations into rice aluminum tolerance mechanisms. *Plant Physiol* 153:1678-1691.
- Fang DQ, Roose ML, Krueger RR and Federicé CT. (1997). Fingerprinting trifoliate orange germplasm accessions with isozymes, RFLPs and intersimple sequence repeat markers. *Theor Appl Genet* 95:211-219.
- Felsenstein J. (2001). PHYLIP (PHYLogeny Inference Package) Version 36a21 Department of Genome Sciences University of Washington Seattle.
- Fernández ME, Figueiras AM, Benito C. (2002). The use of ISSR and RAPD markers for detecting DNA polymorphism, genotype identification and genetic diversity among barley cultivars with known origin. *Theor Appl Genet* 104:845-851.
- Fernández E, García V, Gutiérrez F y Bravo JM. (1971). Estudio comparativo de la fertilidad de los suelos de plátanos en las Islas Canarias. *Anales de Edafología y Agrobiología Madrid* 30:7-8.
- Flavell R. (2009). Role of model plant species. *Methods Mol Biol* 513:1-18.



- Fontecha G, Silva-Navas J, Benito C, Mestres MA, Espino FJ, Hernández-Riquer MV, Gallego FJ. (2007). Candidate gene identification of an aluminum-activated organic acid transporter gene at the Alt4 locus for aluminum tolerance in rye (*Secale cereale* L). *Theor Appl Genet* 114:249-260.
- Foy CD. (1988). Plant adaptation to acid, aluminum-toxic soils. *Commun Soil Sci Plant Anal* 19:959-987.
- Foy CD, Chaney RL, White MC. (1978). The physiology of metal toxicity in plants. *Ann Rev Plant Physiol* 29:511-566.
- Fristensky B. (2007). BIRCH: A user-oriented, locally-customizable, bioinformatics system. *BMC Bioinformatics* 8:54.
- Fry SC, Smith RC, Renwick KF, Martin DJ, Hodge SK and Matthews KJ. (1992). Xyloglucan endotransglycosylase, a new wall-loosening enzyme activity from plants. *Biochem J* 282:821-828.
- Fujii M, Yokosho K, Yamaji N, Saisho D, Yamane M, Takahashi H, Sato K, Nakazono M, Ma JF. (2012). Acquisition of aluminium tolerance by modification of a single gene in barley. *Nat Commun* 3:713.
- Furuichi T, Sasaki T, Tsuchiya Y, Ryan PR, Delhaize E, Yamamoto Y. (2010). An extracellular hydrophilic carboxy-terminal domain regulates the activity of TaALMT1, the aluminum-activated malate transport protein of wheat. *Plant J* 64:47-55.
- Furukawa J, Yamaji N, Wang H, Mitani N, Murata Y, Sato K, Katsuhara M, Takeda K, Ma JJ. (2007). An aluminum-Activated citrate transporter in Barley. *Plant Cell Physiol* 48(8):1081-1091.
- Gabrielson KM, Cancel JD, Morua LF, Larsen PB. (2006). Identification of dominant mutations that confer increased aluminium tolerance through mutagenesis of the Al-sensitive *Arabidopsis* mutant als3-1. *Journal of Experimental Botany* 57:943-951.
- Gallego FG and Benito C. (1997). Genetic control of aluminum tolerance in rye (*Secale cereale* L). *Theor Appl Genet* 95:393-399.
- Garcia-Oliveira AL, Benito C, Prieto P, de Andrade MR, Rodrigues-Pousada C, Guedes-Pinto H, Martins-Lopes P. (2013). Molecular characterization of *TaSTOP1* homoeologues and their response to aluminium and proton (H⁺) toxicity in bread wheat (*Triticum aestivum* L). *BMC Plant Biol* 13:134.
- Garvin DF and Carver BF. (2003). Role of genotype in tolerance to acidity and aluminum toxicity In: Rengel Z. Ed Handbook of soil acidity New York: Marcel Dekker Inc 387-406
- Garvin DF. (2007). *Brachypodium distachyon*: a new model system for structural and functional analysis of grass genomes P 109-123 In RK Varshney and RMD Koebner. (ed). Model plants and crop improvement Taylor and Francis, Boca Raton, FL.
- Garvin DF. (2007b). Spotlight *Brachypodium*: a new monocot model plant system emerges. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 87:1177-1179.
- Garvin DF, Gu YQ, Hasterok R, Hazen SP, Jenkins G, et al. (2008). Development of genetic and genomic research resources for *Brachypodium distachyon*, a new model system for grass crop research. *Crop Sci* 48:69-84.



- Garvin DF, McKenzie N, Vogel JP, Mockler TC, Blankenheim ZJ, Wright J, Cheema JJS, Dicks J, Huo NX, Hayden DM et al. (2010). An SSR-based genetic linkage map of the model grass *Brachypodium distachyon*. *Genome* 53:1-13.
- Gaume A, Mächler F and Frossard E. (2001). Aluminum resistance in two cultivars of *Zea mays* L: root exudation of organic acids and influence of phosphorus nutrition. *Plant and Soil* 234(1):73-81.
- Gaut B. (2002). Evolutionary dynamics of grass genomes. *New Phytol* 154:15-28.
- Geisler-Lee J, Geisler M, Coutinho PM, Segerman B, Nishikubo N, Takahashi J, Aspeborg H, Djerbi S, Master E, Andersson-Gunneras S, Sundberg B, Karpinski S, Teeri TT, Kleczkowski LA, Henrissat B and Mellerowicz EJ. (2006). Poplar carbohydrate-active enzymes Gene identification and expression analyses. *Plant Physiology* 140: 946-962.
- Ghanati F, Morita A, Yokota H. (2005). Effects of aluminum on the growth of tea plant and activation of antioxidant system. *Plant Soil* 276:1-2.
- Giraldo P, Rodríguez-Quijano M, Vázquez JF, Carrillo JM, Benavente E. (2012). Validation of microsatellite markers for cytotype discrimination in the model grass *Brachypodium distachyon*. *Genome* 55:525-527.
- Glaubitz JC. (2004). CONVERT: A user-friendly program to reformat diploid genotypic data for commonly used population genetic software packages. *Mol Ecol Notes* 4:309-310.
- Gomez LD, Bristow JK, Statham ER, McQueen-Mason SJ. (2008). Analysis of saccharification in *Brachypodium distachyon* stems under mild conditions of hydrolysis. *Biotechnology for Biofuels* 1:15.
- Grativol C, da Fonseca Lira-Medeiros C, Hemerly AS, Ferreira PC. (2010). High efficiency and reliability of inter-simple sequence repeats (ISSR) markers for evaluation of genetic diversity in Brazilian cultivated *Jatropha curcas* L accessions. *Mol Biol Rep* doi:101007/s11033-010-0547-7.
- Grsic-Rausch S and Rausch T. (2004). A coupled spectrophotometric enzyme assay for the determination of pectin methylesterase activity and its inhibition by proteinaceous inhibitors. *Anal Biochem* 133:14-18.
- Gruber BD, Ryan PR, Richardson AE, Tyerman SD, Ramesh S, Hebb DM, Howitt SM, Delhaize E. (2010). HvALMT1 from barley is involved in the transport of organic anions. *J Exp Bot* 61:1455-1467.
- Hammami R, Jouve N, Soler C, Frieiro E and Gonzalez JM. (2014). Genetic diversity of SSR and ISSR markers in wild populations of *Brachypodium distachyon* and its close relatives *B stacei* and *B hybridum*. (Poaceae). *Plant Syst Evol* DOI 101007/s00606-014-1021-0.
- Hampl V, Pavlíček A and Flegr J. (2001). Construction and bootstrap analysis of DNA fingerprinting-based phylogenetic trees with the freeware program FreeTree: application to trichomonad parasites. *Int J Syst Evol Microbiol* 51:731-735.
- Han Y, Zhang W, Zhang B, Zhang S, Wang W and Ming F. (2009). One novel mitochondrial citrate synthase from *Oryza sativa* L can enhance aluminum tolerance in transgenic tobacco. *Molecular Biotechnology* 42(3):299-305.



- Handakumbura PP, Matos DA, Osmont KS, Harrington MJ, Heo K, Kafle K, Kim SH, Baskin TI, Hazen SP. (2013). Perturbation of *Brachypodium distachyon* CELLULOSE SYNTHASE A4 or 7 results in abnormal cell walls. BMC Plant Biology 13:131.
- Hayes JE and Ma JF. (2003). Al-induced efflux of organic acid anions is poorly associated with internal organic acid metabolism in triticale roots. Journal of Experimental Botany 54(388):1753-1759.
- Hartwell BL, Pember FR. (1918). The presence of aluminium as a reason for the difference in the effect of so called acid soil on barley and rye. Soil Science 6: 259281.
- Hasterok R, Draper J, Jenkins G. (2004). Laying the cytotaxonomic foundations of a new model grass, *Brachypodium distachyon* (L) Beauv. Chromosome Research 12:397-403.
- Haug A. (1983). Molecular aspects of aluminum toxicity CRC. Crit Rev Plant Sci 1:345-373.
- Hede AR, Skovmand B, López-Cesati J. (2001). Acid Soil and Aluminum Toxicity In: Reynolds MP, Ortiz-Monasterio JJ, MacNab A (eds) Application of physiology in wheat breeding DF: CYMMYT, Mexico, pp 172-182.
- Hede AR, Skovmand B, Ribaut JM, Gonzalez-de-leon D, Støflen O. (2002). Evaluation of aluminium tolerance in a spring rye collection by hydroponic screening. Plant Breeding 121(3):241-248.
- Hetherington PR and Fry SC. (1993). Xyloglucan endotransglycosylase activity in carrot cell suspensions during cell elongation and somatic embryogenesis. Plant Physiol 103:987-992.
- Hillis DM and Bull JJ. (1993). An empirical test of bootstrapping as a method for assessing confidence in phylogenetic analysis. Syst Biol 42:182-192.
- Hoekenga OA, Vision TJ, Shaff JE, et al. (2003). Identification and characterization of aluminum tolerance loci in *Arabidopsis* (Landsberg erecta x Columbia) by quantitative trait locus mapping A physiologically simple but genetically complex trait. Plant Physiology 132(2): 936-948.
- Hoekenga OA, Maron LG, Piñeros MA, Cançado GMA, Shaff J, Kobayashi Y, Ryan PR, Dong B, Delhaize E, Sasaki T, Matsumoto H, Yamamoto Y, Koyama H, Kochian LV. (2006). *AtALMT1*, which encodes a malate transporter, is identified as one of several genes critical for aluminum tolerance in *Arabidopsis*. Proc Nat Acad Sci USA 103(25):9738-9743.
- Horst WJ, Asher CJ, Cakmak I, Szulkiewica P, Wisse meier AH. (1992). Short-term responses of soybean roots to Aluminum. J Plant Physiol 140:174-178.
- Horst WJ. (1995). The role of the apoplast in aluminium toxicity and resistance of higher plants: a review. Z Pflanzenernahr Bodenkd 158:419-428.
- Horst WJ, Schmohl N, Kollmeier M, Baluska F and Sivaguru M. (1999). Does aluminum affect root growth of maize through interaction with the cell wall-plasma membrane-cytoskeleton continuum?. Plant Soil 215:163-174.
- Horst W J, Wang Y and Eticha D. (2010). The role of the root apoplast in aluminium-induced inhibition of root elongation and in aluminium resistance of plants: a review. Annals of botany 106:185-97.
- Hossain AZ, Koyama H, Hara T. (2006). Growth and cell wall properties of two wheat cultivars differing in their sensitivity to aluminum stress. Journal of Plant Physiology 163(1):39-47.



- Hoshino AA, Bravo JP, Nobile PM and Morelli KA. (2012). Microsatellites as Tools for Genetic Diversity Analysis, Genetic Diversity in Microorganisms, Prof Mahmut Caliskan. (Ed), ISBN: 978-953-51-0064-5, InTech, Available from: <http://www.intechopen.com/books/geneticdiversity-in-microorganisms/microsatellites-as-tools-for-genetic-diversity-analysis>
- Huang CF, Yamaji N, Mitani N, Yano M, Nagamura Y, Ma JF. (2009). A bacterial-type ABC transporter is involved in aluminum tolerance in rice. *Plant Cell* 21:655-667.
- Huett DO and Menary RC. (1979). Aluminium uptake by excised roots of cabbage, lettuce and kikuyu grass. *Aust J Plant Physiol* 6:643-653.
- IBI, International Brachypodium Initiative. (2010). Genome sequencing and analysis of the model grass *Brachypodium distachyon*. *Nature* 463:763-768.
- IBSC, International Barley Genome Sequencing Consortium. (2012). A physical, genetic and functional sequence assembly of the barley genome. *Nature* 491:711-716.
- Idziak D, Betekhtin A, Wolny E, Lesniewska K, Wright J, Febrer M, Bevan MW, Jenkins G and Hasterok R. (2011). Painting the chromosomes of *Brachypodium*: current status and future prospects. *Chromosoma* 120:469-79.
- Ishikawa S, Wagatsuma T, Sasaki R, and Ofei-Manu P. (2000). Comparison of the amount of citric and malic acids in Al media of seven plant species and two cultivars each in five plant species. *Soil Science and Plant Nutrition* 46(3):751-758.
- Iuchi S, Koyama H, Iuchi A, Kobayashi Y, Kitabayashi S, Kobayashi Y, Ikka T, Hirayama T, Shinozaki K and Kobayashi M. (2007). Zinc finger protein *STOP1* is critical for proton tolerance in *Arabidopsis* and coregulates a key gene in aluminum tolerance. *Proc Natl Acad Sci USA* 104:9900-9905.
- Iwai H, Kikuchi A, Kobayashi T, Kamada H and Satoh S. (1999). High levels of non-methyl esterified pectins and low levels of peripherally located pectins in loosely attached non-embryogenic callus of carrot. *Plant Cell Reports* 18:561-566.
- Jana T, Sharma TR and Singh NK. (2005). SSR-based detection of genetic variability in the charcoal root rot pathogen *Macrophomina phaseolina*. *Mycol Res* 109:81-86.
- Jarne P and Lagoda PJL. (1996). Microsatellites, from molecules to populations and back. *Trends in Ecology & Evolution* 11(10):424-429.
- Jenkins G, Hasterok R and Draper J. (2003). Building the molecular cytogenetic infrastructure of a new model grass p 77-84 *In* Z Zwierzykowski et al (ed) Application of novel cytogenetic and molecular techniques in genetics and breeding of the grasses. Polish Academy of Sciences, Poznan, Poland.
- Jiménez P y Collada C. (2000). Técnicas para la evaluación de la diversidad genética y uso en los programas de conservación. Investigación Agropecuaria Sist Recur Serie Nº2 Universidad Politécnica de Madrid.
- Johnson JP, Carver BF, Baligar VC. (1997). Productivity in Great Plains acid soils of wheat genotypes selected for aluminium tolerance. *Plant and Soil* 188:101-106.
- Jones DL and Kochian LV. (1995). Aluminum inhibition of the inositol 1,4,5-triphosphate signal transduction pathway in wheat roots - a role in aluminum toxicity. *Plant Cell* 7:1913-1922.



- Jones DL, Blancaflor EB, Kochian LV, Gilroy S. (2006). Spatial coordination of aluminum uptake, production of reactive oxygen species, callosa production and wall rigidification in maize roots. *Plant Cell Environ* 29:1309-1318.
- Jones DT. (1999). Protein secondary structure prediction based on position-specific scoring matrices. *J Mol Biol* 292:195-202.
- Kaçar YA, Şimsek Ö, Dönmez D, Boncuk M, Yesiloglu T and Ollitrault P. (2014). Genetic relationships of some *Citrus* genotypes based on the candidate iron chlorosis genes. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry* 38.
- Kantety RV, Zeng XP, Bennetzen JL and Zehr BE. (1995). Assessment of genetic diversity in Dent and Popcorn. (*Zea mays* L). inbred lines using intersimple sequence repeat (ISSR) amplification. *Mol Breed* 1:365-373.
- Karsai I, Bedo Z, Kovacs G and Barnabas B. (1994). The effect of *in vivo* and *in vitro* aluminium treatment on another culture response of triticale × wheat hybrids. *J Genet Breed* 48:353-358.
- Kauss H. (1992). Callose and callose synthase *In* SJ Gurr, MJ McPherson, DJ Bowles, eds, *Molecular Plant Morphology: A Practical Approach* 2:1-8.
- Kawaura K, Mochida K, Enju A, Totoki Y, Toyoda A, Sakaki Y et al. (2009). Assessment of adaptive evolution between wheat and rice as deduced from full-length common wheat cDNA sequence data and expression patterns. *BMC Genomics* 10:271
- Keeler KH. (1990). Distribution of polyploid variation in big bluestem (*Andropogon gerardii*, Poaceae) across the tallgrass prairie region. *Genome* 33:95-100.
- Kennedy IR. (1986). *Acid soil and acid rain: the impact on the environment of nitrogen and sulphur cycling* Research Studies Press, Letchworth, UK.
- Kerven GL, Edwards DG, Asher CJ, Hallman PS, Kobot S. (1989). Aluminium determination in soil solution I Evaluation of existing colorimetric and separation methods for the determination of inorganic monomeric aluminium in the presence of organic acid ligands. *Australian Journal of Soil Research* 27:79-90.
- Kidd PS, Llugany M, Poschenrieder C, Gunsé B, and Barceló J. (2001). The role of root exudates in aluminium resistance and silicon-induced amelioration of aluminium toxicity in three varieties of maize (*Zea mays* L). *Journal of Experimental Botany* 52(359):1339-1352.
- Kim DY, Hong MJ, Jang JH and Seo YW. (2012). cDNA-AFLP analysis reveals differential gene expression in response to salt stress in *Brachypodium distachyon*. *Genes & Genomics* 34:475-484.
- Kinraide TB, Ryan PR, Kochian LV. (1992). Interactive effects of Al³⁺, H⁺, and other cations on root elongation considered in terms of cell-surface electrical potential. *Plant Physiology* 99:1461-1468.
- Kitagawa T, Morishita T, Tachibana Y, Namai H, and Ohta Y. (1986). Differential aluminum resistance of wheat varieties and organic acid secretion. *Japanese Journal of Soil Science and Plant Nutrition* 57(4):352-358.
- Kobayashi Y and Koyama H. (2002). QTL analysis of Al tolerance in recombinant inbred lines of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol* 43:1526-1533.



- Kochian LV. (1995). Cellular mechanisms of aluminum toxicity and resistance in plants. *Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 46:237-260.
- Kochian LV, Piñeros MA and Hoekenga OA. (2005). The physiology, genetics and molecular biology of plant aluminum resistance and toxicity. *Plant and Soil* 274(1-2):175-195.
- Kochian LV, Hoekenga OA, Pineros MA. (2004). How do crop plants tolerate acid soils? Mechanisms of aluminum tolerance and phosphorous efficiency. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 55:459-493.
- Kollmeier M, Dietrich P, Bauer C S, Horst W J, and Hedrich R. (2001). Aluminum activates a citrate-permeable anion channel in the aluminum-sensitive zone of the maize root apex A comparison between an aluminum-sensitive and an aluminum-resistant cultivar. *Plant Physiology* 126(1):397-410.
- Kondrakhin YV, AE Kel, NA Kolchanov, AG Romashchenko, and L Milanesi. (1995). Eukaryotic promoter recognition by binding sites for transcription factors. *Comput Appl Biosci* 11:477-488.
- Koyama H, Takita E, Kawamura A, Hara T, and Shibata D. (1999). Over expression of mitochondrial citrate synthase gene improves the growth of carrot cells in Al-phosphate medium. *Plant and Cell Physiology* 40(5):482-488.
- Krill AM, Kirst M, Kochian LV, Buckler ES, Hoekenga OA. (2010). Association and Linkage Analysis of Aluminum Tolerance Genes in Maize. *PLoS ONE* 5(4): e9958
- Krogh A, Larsson B, von Heijne G and Sonnhammer ELL. (2001). Predicting Transmembrane Protein Topology with a Hidden Markov Model: Application to Complete Genomes. *J Mol Biol* 305:567-580.
- Kumar S, Tamura K, Nei M. (2004). MEGA3: an integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. *Brief Bioinform* 5:150-163.
- Kumari M, Taylor GJ, Deyholos MK. (2008). Transcriptomic responses to aluminum stress in roots of *Arabidopsis thaliana*. *Molecular Genetics and Genomics* 279: 339-357.
- Larsen PB, Tai CY, Kochian LV and Howell SH. (1996). *Arabidopsis* mutants with increased sensitivity to aluminium. *Plant Physiol* 110:743-751.
- Larsen PB, Geisler MJB, Jones CA, Williams KM, Cancel JD. (2005). ALS3 encodes a phloem-localized ABC transporter-like protein that is required for aluminum tolerance in *Arabidopsis*. *Plant J* 41:353-363.
- Larsen PB, Cancel J, Rounds M, Ochoa V. (2007). *Arabidopsis* ALS1 encodes a root tip and stele localized half type ABC transporter required for root growth in an aluminum toxic environment. *Planta* 225(6):1447-1458.
- Lazof DB, Goldsmith JG, Rufty TW, Linton RW. (1996). The early entry of Al into cells of intact soybean roots A comparison of three developmental root regions using secondary ion mass spectrometry imaging. *Plant Physiology* 112:1289-1300.

- Lee W-S, Hammond-Kosack KE, Kanyuka K. (2012). Barley stripe mosaic virus-mediated tools for investigating gene function in cereal plants and their pathogens: VIGS, HIGS and VOX. *Plant Physiol* 160(2):582-590.
- Li XF, Zuo FH, Ling GZ et al. (2009). Secretion of citrate from roots in response to aluminum and low phosphorus stresses in *Stylosanthes*. *Plant and Soil* 325(1):219-229.
- Li Z and Xing D. (2011). Mechanistic study of mitochondria- dependent programmed cell death induced by aluminium phytotoxicity using fluorescence techniques. *J Exp Bot* 62:331-343.
- Li J, Ding J, Zhang W, Zhang YL, Tang P, Chen JQ, Tian DC, Yang SH. (2010). Unique evolutionary pattern of numbers of gramineous NBS-LRR genes. *Molecular Genetics and Genomics* 283:427-438.
- Li C, Rudi H, Stockinger EJ, Cheng H, Cao M, Fox SE, Mockler TC, Westereng B, Fjellheim S, Rognli OA, Sandve SR. (2012). Comparative analyses reveal potential uses of *Brachypodium distachyon* as a model for cold stress responses in temperate grasses. *BMC Plant Biol* 12:65.
- Li XF, Ma JF and Matsumoto H. (2000). Pattern of Al-induced secretion of organic acids differs between rye and wheat. *Plant Physiol* 123:1537-1543.
- Liao H, Wan H, Shaff J, Wang X, Yan X, and Kochian L V. (2006). Phosphorus and aluminum interactions in soybean in relation to aluminum tolerance Exudation of specific organic acids from different regions of the intact root system. *Plant Physiology* 141(2):674-684.
- Ligaba A, Shen H, Shibata K, Yamamoto Y, Tanakamaru S and Matsumoto H. (2004). The role of phosphorus in aluminiuminduced citrate and malate exudation from rape (*Brassica napus*). *Physiologia Plantarum* 120(4):575-584.
- Ligaba A, Katsuhara M, Ryan P R, Shibasaka M, and Matsumoto H. (2006). The *BnALMT1* and *BnALMT2* genes from rape encode aluminum-activated malate transporters that enhance the aluminum resistance of plant cells. *Plant Physiology* 142(3):1294-1303.
- Ligaba A, Maron L, Shaff J, Kochian L, Piñeros M. (2012). Maize ZmALMT2 is a root anion transporter that mediates constitutive root malate efflux. *Plant Cell Environ* 35:1185-1200.
- Ligaba A, Dreyer I, Margaryan A, Schneider DJ, Kochian L, Piñeros M. (2013). Functional, structural and phylogenetic analysis of domains underlying the Al sensitivity of the aluminum-activated malate/anion transporter, TaALMT1. *Plant J* 76:766-780.
- Little R. (1988). Plant soil interactions at low pH In: Problem Solving - The Genetic Approach. *Commun Soil Sci Plant Anal* 19:1239-1257.
- Liu G Y. (2008). Barley NADP-dependent malic enzyme Yunnan Agricultural University, Kunming, China Submitted 3-AUG-2008 GenBank: EU9771791
- Liu J, Magalhaes JV, Shaff J and Kochian LV. (2009). Aluminum activated citrate and Malate transporters from the *MATE* and *ALMT* families function independently to confer *Arabidopsis* aluminum tolerance. *Plant J* 57:389-399.
- Livak KJ, Schmittgen TD. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(-Delta Delta C(T)) method. *Methods* 25:402-408.



- Lobell DB, Schlenker W, Costa-Roberts J. (2011). Climate trends and global crop production since 1980. *Science* 333:616-620.
- López Arias, M y Grau Corbí, JM. (2004). Metales pesados, materia orgánica y otros parámetros de la capa superficial de los suelos agrícolas y de pastos de España peninsular Resultados por Provincias II Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria. (INIA). Ministerio de Educación y Ciencia de España.
- Luo MC and Dvorák J. (1996). Molecular mapping of an aluminium tolerance locus on chromosome 4D of Chinese Spring wheat. *Euphytica* 91:31-35.
- Ma JF, Zheng SJ, Hiradate S and Matsumoto H. (1997). Detoxifying aluminum with buckwheat. *Nature* 390: 569-570.
- Ma Z, Miyasaka SC. (1998). Oxalate exudation by taro in response to Al. *Plant Physiology* 118: 861-865.
- Ma JF, Chen ZC, Shen RF. (2014). Molecular mechanisms of Al tolerance in gramineous plants. *Plant and Soil* Doi: 101007/s11104-014-2073-1.
- Ma JF, Ryan PR, Delhaize E. (2001). Aluminium tolerance in plants and the complexing role of organic acids. *Trends Plant Sci* 6:273-278.
- Ma JF, Taketa S, and Yang ZM. (2000). Aluminum tolerance genes on the short arm of chromosome 3R are linked to organic acid release in triticale. *Plant Physiology* 122(3):687-694.
- Ma JF. (2000). Role of organic acids in detoxification of aluminum in higher plants. *Plant Cell Physiol* 41:384-390.
- Ma JF, Nagao S, Sato K, Ito H, Furukawa J, Takeda K. (2004). Molecular mapping of a gene responsible for Al-activated secretion of citrate in barley. *Journal of Experimental Botany* 55:1335-1341.
- Ma JF, Shen R, Zhao Z, Wissuwa M, Takeuchi Y, Ebitani T, Yano M. (2002). Response of rice to Al stress and identification of quantitative trait loci for Al tolerance. *Plant Cell Physiol* 43:652-659.
- Magalhaes JV, Garvin DF, Wang Y, Sorrells ME, Klein PE, Schaffert RE, Li L, Kochian LV. (2004). Comparative mapping of a major aluminum tolerance gene in sorghum and other species in the Poaceae. *Genetics* 167(4):1905-1914.
- Magalhaes JV, Liu J, Guimaraes CT, Lana GP, Alves MC, Wang YH, Schaffert RE, Hoekenga OA, Piñeros MA, Shahh JE, Klein PE, Carneiro NP, Coelho CM, Trick HN, Kochian LV. (2007). A gene in the multidrug and toxic compound extrusion (MATE) family confers aluminium tolerance in sorghum. *Nature Genetics* 39(9):1156-1161.
- Mailloux RJ, Lemire J, Kalyuzhnyi S and Appanna V. (2008). A novel metabolic network leads to enhanced citrate biogenesis in *Pseudomonas fluorescens* exposed to aluminum toxicity. *Extremophiles* 12:451-459.
- Manifesto M M, Schlatter A R, Hopp H E, Suárez E Y and Dubcovsky J. (2001). Quantitative evaluation of genetic diversity in wheat germplasm using molecular markers. *Crop Sci* 41:682-690.
- Manyova NM, Miller TE, Forster BP. (1988). Alien species as sources for aluminium tolerance genes for wheat, *Triticum aestivum* Proc 7th Int Wheat Genet Symp pp 851-857.



- Manzaneda AJ, Rey PJ, Bastida JM, Weiss-Lehman C, Raskin E and Mitchell-Olds T. (2012). Environmental aridity is associated with cytotype segregation and polyploidy occurrence in *Brachypodium distachyon* (Poaceae). *New Phytol* 193(3):797-805.
- Maron LG, Kirst M, Mao C, Milner MJ, Menossi M, Kochian LV. (2008). Transcriptional profiling of aluminum toxicity and tolerance responses in maize roots. *New Phytologist* 179:116-128.
- Maron LG, Pineros MA, Guimaraes CT, Magalhaes JV, Pleiman JK, Mao CZ, Shaff J, Belicuas SNJ, Kochian LV. (2010). Two functionally distinct members of the *MATE* (multi-drug and toxic compound extrusion) family of transporters potentially underlie two major aluminum tolerance *QTLs* in maize. *The Plant Journal* 61:728-740.
- Maron LG, Guimarães CT, Kirst M, et al. (2013). Aluminum tolerance in maize is associated with higher *MATE1* gene copy number. *Proc Natl Acad Sci USA* 110:5241-5246.
- Marschner H. (1991). Mechanisms of adaptation of plants to acid soils. *Plant Soil* 133:1-20.
- Marschner, H. (1995). Mineral nutrition of higher plants. Academic Press: London, 889 pp.
- Martín JP and Sánchez-Yélamo MD. (2000). Genetic relationships among species of the genus *Diplotaxis* (Brassicaceae) using inter-simple sequence repeat markers. *Theor Appl Genet* 101:1234-1241.
- Matos M, Pinto-Carnide O, Benito C. (2001). Phylogenetic relationships among Portuguese rye based on isozyme, RAPD and ISSR markers. *Hereditas* 134(3):229-236.
- Matsumoto T, Tanaka T, Sakai H, Amano N, Kanamori H, Kurita K, Kikuta A, Kamiya K, Yamamoto M, Ikawa H, Fujii N, Hori K, Itoh T and Sato K. (2011). Comprehensive sequence analysis of 24,783 barley full-length cDNAs derived from twelve clone libraries. *Plant Physiol* 156:20-28.
- Mattiello L, Kirst M, da Silva F, Jorge R and Menossi M. (2010). Transcriptional profile of maize roots under acid soil growth. *BMC Plant Biology* 10:196.
- Mauseth JD. (2003). Botany An Introduction to Plant Biology 3/e Jones and Bartlett Publishers, Inc Sudbury, Massachusetts.
- Mayer C. (2010). Phobos 3.3.1.1, http://www.rubde.spezzoo/cm/cm_phoboshtm.
- Mayer K et al. (1999). Sequence and analysis of chromosome 4 of the plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* 402:769-777.
- McCallum CM, Comai L, Greene EA, Henikoff S. (2000). Targeted screening for induced mutations. *Nature Biotechnology* 18:455-457.
- McCouch SR, Teytelman L, Xu Y, et al. (2002). Development and mapping of 2240 new SSR markers for rice (*Oryza sativa* L). *DNA Res* 9:199-207.
- Meriga B, Attitala IH, Ramgopal M, Ediga A, Kavikishor PB. (2010). Differential tolerance to aluminium toxicity in rice cultivars: involvement of antioxidative enzymes and possible role of aluminium resistant locus. *Acad J Plant Sci* 3:53-63.
- Métais I, Aubry C, Hamon B and Jalouzot R. (2000). Description and analysis of genetic diversity between commercial bean lines (*Phaseolus vulgaris* L). *Theor Appl Genet* 101:1207-1214.



- Miyasaka SC and Hawes MC. (2001). Possible role of root border cells in detection and avoidance of aluminum toxicity. *Plant Physiol* 125:1978-1987.
- Miyasaka SC, George Buta J, Howell RK, and Foy CD. (1991). Mechanism of aluminum tolerance in snapbeans: root exudation of citric acid. *Plant Physiology* 96(3):737-743.
- Morgante M and Olivieri AM. (1993). PCR-amplified microsatellites as markers in plant genetics. *Plant J* 3:175-182.
- Motoda H, Sasaki T, Kano Y, Ryan PR, Delhaize E, Matsumoto H, Yamamoto Y. (2007). The membrane topology of ALMT1, an aluminum-activated malate transport protein in wheat (*Triticum aestivum*). *Plant Signal Behav* 2: 467-472.
- Moustakas AM, Nari J, Borel M, Noat G and Ricard J. (1991). Pectin methylesterase, metal ions and plant cell-wall extension. *Biochem J* 279:351-354.
- Mur LA, Allainguillaume J, Catalan P, Hasterok R, Jenkins G, et al. (2011). Exploiting the Brachypodium Tool Box in cereal and grass research. *New Phytology* 191:334-347.
- Mugwira LM, Patel SU. (1977). Root zone pH changes and ion uptake imbalances by triticale, wheat, and rye. *Agronomy Journal* 69:719-722.
- Mugwira LM, Elgawhary SM, Patel KI. (1976). Differential tolerances of *Triticale*, wheat, rye and barley to aluminum in nutrient solution. *Agron J* 68:782-787.
- Mugwira LM, Elgawhary SM, and Patel SU. (1978). Aluminium tolerance in triticale, wheat and rye as measured by root growth characteristics and aluminium concentrations. *Plant and Soil* 50:681-690.
- Mullis K and Faloona F. (1987). Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase catalyzed chain reaction. *Methods in Enzymology* 155:335-350.
- Muthusamy S, Kanagarajan S and Ponnusamy S. (2008). Efficiency of RAPD and ISSR markers system in accessing genetic variation of rice bean (*Vigna umbellata*) landraces. *Electronic J Biotechnol* 11:3.
- Nagaoka T and Ogihara Y. (1997). Applicability of inter-simple sequence repeat polymorphisms in wheat for use as DNA markers in comparison to RFLP and RAPD markers. *Theor Appl Genet* 94:597-602.
- Nava IC, Delatorre CA, de Lima Duarte IT, Pacheco MT, Federizzi LC. (2006). Inheritance of aluminum tolerance and its effects on grain yield and grain quality in oats (*Avena sativa* L). *Euphytica* 148:353-358.
- Nei M. (1973). The theory and estimation of genetic distance, pp 45-54 in *Genetic Structure of Populations*, edited by N E Morton University Press of Hawaii, Honolulu.
- Neigel JE and Avise AC. (1986). Phylogenetic relationship of mitochondrial DNA under various models of speciation In *Evolutionary Processes and Theory*, pp 515-534 Edited by S Karlin & E Nevo New York: Academic Press.
- Ninamango-Cárdenas FE, et al. (2003). Mapping QTLs for aluminum tolerance in maize. *Euphytica* 130(2):223-232.



- Nishitani K and Tominaga R. (1992). Endo-xyloglucan transferase, a novel class of glycosyltransferase that catalyzes transfer of a segment of xyloglucan molecule to another xyloglucan molecule. *J Biol Chem* 267:21058-21064.
- Nguyen VT, Burow MD, Nguten HT, Le BT, Le TD, Paterson AH. (2001). Molecular mapping of genes conferring aluminum tolerance in rice (*Oryza sativa* L). *Theor Appl Genet* 102:1002-1010.
- Nguyen NT, Nakabayashi K, Thompson J and Fujita K. (2003). Role of exudation of organic acids and phosphate in aluminum tolerance of four tropical woody species. *Tree Physiology* 23(15):1041-1050.
- Ofei-Manu P, Wagatsuma T, Ishikawa S and Tawaraya K. (2001). The plasma membrane strength of the root-tip cells and root phenolic compounds are correlated with Al tolerance in several common woody plants. *Soil Sci Plant Nutr* 47:359-375.
- Ohler U, Harbeck S, Niemann H, Nöth E and Reese MG. (1999). Interpolated Markov chains for eucaryotic promoter recognition. *Bioinformatics* 15:363-369.
- Okazawa K, Sato Y, Nakagawa T, Asada K, Kato I, Tomita E and Nishitani K. (1993). Molecular cloning and cDNA sequencing of endoxyloglucan transferase, a novel class of glycosyltransferase that mediates molecular grafting between matrix polysaccharides in plant cell walls. *J Biol Chem* 268:25364-25368.
- Osawa H and Kojima K. (2006). Citrate-release-mediated aluminum resistance is coupled to the inducible expression of mitochondrial citrate synthase gene in *Paraserianthes falcataria*. *Tree Physiology* 26(5):565-574.
- Ownby JD. (1993). Mechanisms of reaction of hematoxylin with aluminium treated wheat roots. *Physiol Plant* 87:371-380.
- Pacak A, Geisler K, Jorgensen B, Barciszewska-Pacak M, Nilsson L, Nielsen TH, Johansen E, Gronlund M, Jakobsen I, Albrechtsen M. (2010). Investigations of barley stripe mosaic virus as a gene silencing vector in barley roots and in *Brachypodium distachyon* and oat. *Plant Methods* 6:26-33.
- Page RDM. (1996). TREEVIEW: An application to display phylogenetic trees on personal computers. *Computer Applications in the Biosciences* 12:357-358.
- Pandey S, et al. (1994). Genetics of tolerance to soil acidity in tropical maize. *Crop Sci* 34(6):1511-1514.
- Papernik LA, Bethea AS, Singleton TE, Magalhaes JV, Garvin DF and Kochian LV. (2001). Physiological basis of reduced Al tolerance in ditelosomic lines of Chinese Spring wheat. *Planta* 212:829-834.
- Paterson AH, et al. (2009). The Sorghum bicolor genome and the diversification of grasses. *Nature* 457:551-556.
- Peixoto PHP, Cambrain J, Anna RS, Mosquim PR, Moreira MA. (1999). Aluminium effects on lipid peroxidation and on the activities of enzymes of oxidative metabolism in sorghum. *Br J Plant Physiol* 11:137-145.
- Pejic I, Ajmone-Marsan P, Morgante M, Kozumplick V, Castiglioni P, Taramino G and Motto M. (1998). Comparative analysis of genetic similarity among maize inbred lines detected by RFLPs. *Theor Appl Genet* 98:1248-1255.



- Pellet DM, Grunes DL and Kochian LV. (1995). Organic acid exudation as an aluminum-tolerance mechanism in maize (*Zea mays* L). *Planta* 196:788-795.
- Pereira JF, Zhou G, Delhaize E, Richardson T, Ryan PR. (2010). Engineering greater aluminium resistance in wheat by over-expressing *TaALMT1*. *Annals of Botany* 106:205-214.
- Persson B and Argos P. (1997). Prediction of membrane protein topology utilizing multiple sequence alignments. *J Protein Chem* 16:453-457.
- Picton SJ, Richards KD, Gardner RC. (1991). Protein profiles in root tips of two wheat (*Triticum aestivum* L) cultivars with differential tolerance to aluminum. *Plant soil interactions at low pH in: Plant and soil Sciences* 45:1063-1070.
- Pilling J. (2004). Inhibition of a ubiquitously expressed pectin methyl esterase in (*Solanum tuberosum* L) affects plant growth, leaf growth polarity, and ion partitioning. *Planta* 219:32-40.
- Piñeros MA, Cançado GMA, and Kochian LV. (2008). Novel properties of the wheat aluminum tolerance organic acid transporter (TaALMT1) revealed by electrophysiological characterization in *Xenopus oocytes*: functional and structural implications. *Plant Physiology* 147(4):2131-2146.
- Polle E, Konzak CF, Kittrick JA. (1978). Visual detection of aluminum tolerance levels in wheat by hematoxylin staining of seedling roots. *Crop Sci* 18:823-827.
- Potter I and Fry SC. (1993). Xyloglucan endotransglycosylase activity in pea internodes Effects of applied gibberellic acid. *Plant Physiol* 103:235-241.
- Powell W, Morgante M, Andre C, McNicol JW, Machray GC, Doyle JJ, Tingey SV and Rafalski JA. (1995). Hypervariable microsatellites provide a general source of polymorphic DNA markers for the chloroplast genome *Current Biology* 5(9):1023-1029.
- Prevost A and Wilkinson MJ. (1999). A new system of comparing PCR partidores applied to ISSR fingerprinting of potato cultivars. *Theor Appl Gen* 98:107-112.
- Pritchard J, Hetherington PR, Fry SC and Tomos A. (1993). Xyloglucan endotransglycosylase activity, microfibril orientation and the profiles of cell wall properties along growing regions of maize roots. *J Exp Bot* 44:1281-1289.
- Qin R, Hirano Y and Brunner I. (2007). Exudation of organic acid anions from poplar roots after exposure to Al, Cu and Zn. *Tree Physiology* 27(2):313-320.
- Radmer L, Tesfaye M, Somers D, Temple S, Vance C and Samac D. (2012). Aluminum resistance mechanisms in oat (*Avena sativa* L). *Plant and Soil* 351:121-134.
- Rajaram S, Villegas E. (1990). Breeding wheat (*Triticum aestivum*) for aluminium toxicity tolerance at CIMMYT In: *Genetic aspects of plant mineral nutrition* Kluwer Academic Publishers pp 489-495.
- Rancour DM, Marita JM, Hatfield RD. (2012). Cell wall composition throughout development for the model grass *Brachypodium distachyon*. *Frontiers in Plant Science* 3:266.
- Raman H, Zhang KR, Cakir M, et al. (2005). Molecular characterization and mapping of *ALMT1*, the aluminium-tolerance gene of bread wheat (*Triticum aestivum* L). *Genome* 48:781-791.



- Raman H. (2013). Aluminum tolerance in wheat Conference International Plant & animal genome XXI W422 panel January 12-16 San Diego, California.
- Rambaut A. (2012). Figtree version 140 [Internet] Available from: <http://treebioedacuk/software/figtree/>. (last accessed March 29, 2013).
- Rengel Z and Zhang WH. (2003). Role of dynamics of intracellular calcium in aluminum toxicity syndrome. *New Phytol* 159:295-314.
- Rengel Z, Jurkic V. (1993). Evaluation of *Triticum aestivum* germplasm from Croatia and Yugoslavia for aluminum tolerance. *Euphytica* 66:111-116.
- Reuss JO and Johnson DW. (1986). Acid deposition and the acidification of soils and waters New York: Springer Ecological studies 59.
- Rincón M, González RA. (1991). Induction of protein synthesis by aluminum in wheat (*Triticum aestivum* L) root tips Kluwer. Academic Publishers pp 851-858.
- Rita J y Rosello JA. (1989). *Gisaspium mouretii* Corb en las Islas Baleares. *Acta Botánica Malacitana* 14:73-80.
- Robertson IH. (1981). Chromosome numbers in *Brachypodium* Beauv (Gramineae). *Genetica* 56: 55-60.
- Rohlf FJ. (1993). NTSYS-pc, numerical taxonomy and multivariate analysis system. Applied biostatistical Inc, New York, USA.
- Roldan-Ruiz I, Dendauw J, Vanbockstaele E, Depicker A, De Loose M. (2000). AFLP markers reveal high polymorphic rates in ryegrasses (*Lolium* spp). *Mol Breed* 6:125-134.
- Rose JKC, Braam J, Fry SC, Nishitani K. (2002). The XTH family of enzymes involved in xyloglucan endotransglucosylation and endohydrolysis: current perspectives and a new unifying nomenclature. *Plant Cell Physiol* 43:1421-1435.
- Rost B, G Yachdav and J Liu. (2004). The Predict Protein Server *Nucleic Acids Research* 32(Web Server issue): W321-W326.
- Ruiz-Torres NA, Carver BF, Westerman RL. (1992). Agronomic performance in acid soils of wheat lines selected for hematoxylin staining pattern. *Crop Sci* 32:104-107.
- Ryan PR, Delhaize E and Randall PJ. (1995). Malate efflux from root apices and tolerance to aluminium are highly correlated in wheat. *Aust J Plant Physiol* 22: 531-536.
- Ryan PR, Ditomaso JM, Kochian LV. (1993). Aluminum toxicity in roots: An investigation of spatial sensitivity and the role of the root cap. *J Exp Bot* 44:437-446.
- Ryan PR, Raman H, Gupta S, Horst WJ, Delhaize E. (2009). A second mechanism for aluminum resistance in wheat relies on the constitutive efflux of citrate from roots. *Plant Physiology* 149:340-351.
- Ryan PR, Raman H, Gupta S, Sasaki T, Yamamoto Y, Delhaize E. (2010). Multiple origins of aluminium resistance in hexaploid wheat are derived from *Aegilops tauschii* and from more recent cis mutations to *TaALMT1*. *The Plant Journal* 64(3):446-455.



- Ryan PR, Tyerman SD, Sasaki T, Furuchi T, Yamato Y, Zhang WH, Delhaize E. (2011). The identification of aluminium-resistance genes provides opportunities for enhancing crop production on acid soils. *J Exp Bot* 62:9-20.
- Ryu JY, Hong SY, Jo SH, Woo JC, Lee S, Park CM. (2014). Molecular and functional characterization of cold-responsive C-repeat binding factors from *Brachypodium distachyon*. *BMC Plant Biol* 14:15
- Saber N, Abdel-Moneim A and Barakat S. (1999). Role of organic acids in sunflower tolerance to heavy metals. *Biologia Plantarum* 42:65-73.
- Saiki RK, Scharf SJ, Fallona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA and Arnheim N. (1985). Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230(4732):1350-1354.
- Salanoubat M, et al. (2000). Sequence and analysis of chromosome 3 of the plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* 408:820-822.
- Sasaki T, Yamamoto Y, Ezaki Y, Katsuhara M, Ahn SJ, Ryan PR, Delhaize E, Matsumoto H. (2004). A wheat gene encoding an aluminum-activated malate transporter. *Plant Journal* 37(5):645-653.
- Sasaki T, Ryan PR, Delhaize E, Hebb DM, Ogihara Y, Kawaura K, Noda K, Kojima T, Toyoda A, Matsumoto H, Yamamoto Y. (2006). Sequence Upstream of the Wheat (*Triticum aestivum* L) *ALMT1* Gene and Its Relationship to Aluminum Resistance. *Plant Cell Physiol* 47(10):1343-54.
- Sato K, Shin-I T, Seki M, Shinozaki K, Yoshida H, Takeda K, Yamazaki Y, Conte M and Kohara Y. (2009). Development of 5006 full-length cDNAs in barley: A tool for accessing cereal genomics resources. *DNA Res* 16:81-89.
- Sawaki Y, Iuchi S, Kobayashi Y, Kobayashi Y, Ikka T, Sakurai N, Fujita M, Shinozaki K, Shibata D, Kobayashi M, Koyama H. (2009). STOP1 regulates multiple genes that protect *Arabidopsis* from proton and aluminum toxicities. *Plant Physiol* 150:281-294.
- Scandalios JG. (2002). The rise of ROS. *Trends in Biochemical Sciences* 27:483-486.
- Shen Z, Qu W, Wang W, et al. (2010). MPprimer: a program for reliable multiplex PCR primer design. *BMC Bioinformatics* 11:143.
- Schnable PS, Ware D, Fulton RS, Stein JC, Wei F, et al. (2009). The B73 maize genome: complexity, diversity and dynamics. *Science* 326: 1112-1115.
- Schippmann U. (1991). Revision of the European species of the genus *Brachypodium* Palisot De Beauvois Poaceae. *Boissiera* 45: 1-250
- Schöttelndreier M, Norddahl M M, Ström L and Falkengren-Grerup U. (2001). Organic acid exudation by wild herbs in response to elevated Al concentrations. *Annals of Botany* 87(6):769-775.
- Schroeder JI, Delhaize E, Frommer WB, Guerinot ML, Harrison MJ, Herrera-Estrella L, Horie T, Kochian LV, Munns R, Nishizawa NK, Tsay YF, Sanders D. (2013). Using membrane transporters to improve crops for sustainable food production. *Nature* 497:60-66.
- Schreiner KA, Hoddinott J, Taylor GJ. (1994). Aluminum-induced deposition of (1,3)-beta-glucans (callose) in *Triticum aestivum* L. *Plant Soil* 162:273-280.



- Schützendübel A and Polle A,. (2002). Plant responses to abiotic stresses: heavy metal-induced oxidative stress and protection by mycorrhization. *J Exp Bot* 53:1351-1365.
- Shafieizargar A, Awang Y, Shukor J A, Othman R. (2013). Comparative studies between diploid and tetraploid Dez Orange [*Citrus sinensis* (L) Osb] under salinity stress. *Australian Journal of Crop Science* 7(10):1436-1441.
- Shi Y, Draper J and Stace C. (1993). Ribosomal DNA variation and its phylogenetic implications in the genus *Brachypodium* (Poaceae). *Plant Systematics Evol* 188:125-138.
- Shi BJ, Gustafson JP, Button J, Miyazaki J, Pallotta M, Gustafson N, Zhou H, Langridge P, Collins NC. (2009). Physical analysis of the complex rye (*Secale cereale* L) Alt4 aluminium (aluminum) tolerance locus using a whole-genome BAC library of rye cv Blanco. *Theoretical and Applied Genetics* 119: 695-704
- Silva I, Smyth T, Moxley D, Carter T, Allen N and Rufty T. (2000). Aluminum accumulation at nuclei of cells in the root tip Fluorescence detection using lumogallion and confocal laser scanning microscopy. *Plant Physiol* 123:543-552.
- Silva-Navas, J, Benito C, Téllez-Robledo B, Abd El-Moneim D, Gallego FJ. (2012). The *ScAACT1* gene at the *Qalt₅* locus as a candidate for increased aluminum in rye (*Secale cereale* L). *Mol Breeding* 30(2):845-856.
- Sivaguru M, Baluska F, Volkmann D, Felle HH, Horst WJ. (1999). Impacts of aluminum on the cytoskeleton of the maize root apex Short term effects on the distal part of the transition zone. *Plant Physiol* 119:1073-1082.
- Sivaguru M, Liu J, Kochian LV. (2013). Targeted expression of *SbMATE* in the root distal transition zone is responsible for sorghum aluminum resistance. *Plant J* 76:297-307.
- Smith BG and Harris PJ. (1999). The polysaccharide composition of Poales cell walls: Poaceae cell walls are not unique. *Biochem Syst Ecol* 27:33-53.
- Smith JSC, Chin ECL, Shu H, Smith OS, Wall SJ, Senior ML, Mitchell SE, Kresovich S, Ziegler J. (1997). An evaluation of the utility of SSR loci as molecular markers in maize. (*Zea mays* L): comparison with data from RFLPs and pedigree. *Theor Appl Genet* 95:163-173.
- Sneath PHA and Sokal RR. (1973). Numerical Taxonomy The principles and practice of numerical classification. WH Freeman and Co, San Francisco, USA.
- Sofalian O, Chaparzadeh N, Javanmard A, Hejazi MS. (2008). Study the genetic diversity of wheat Landraces from Northwest of Iran based on ISSR molecular markers. *Inter J Agri and Bio* ISSN online: 466-468
- Somerville C, Youngs H, Taylor C, Davis SC and Long SP. (2010). Feedstocks for lignocellulosic biofuels. *Science* 329:790-792.
- Sonah H, Deshmukh RK, Sharma A, Singh VP, Gupta DK, et al. (2011). Genome-Wide Distribution and Organization of Microsatellites in Plants: An Insight into Marker Development in *Brachypodium*. *PLoS ONE* 6(6): e21298.



- Soranzo N, Provan J and Powell W. (1999). An example of microsatellite length variation in the mitochondrial genome of conifers. *Genome* 42(1):158-161.
- Stølen O, Andersen S. (1978). Inheritance of tolerance to low soil pH in barley. *Hereditas* 88:101-105.
- Suhayda CG and Haug A. (1985). Citrate chelation as a potential mechanism against aluminum toxicity in cells: the role of calmodulin. *Can J Biochem Cell Biol* 63:1167-1175.
- Sun L, Liang C, Chen Z, Liu P, Tian J, Liu G and Liao H. (2013). Superior aluminium (Al) tolerance of *Stylosanthes* is achieved mainly by malate synthesis through an Al-enhanced malic enzyme, *SgME1*. *New Phytol* 202(1):209-219.
- Tabata S, Kaneko T, Nakamura Y, Kotani H, Kato T, et al. (2000). Sequence and analysis of chromosome 5 of the plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* 408:823-826.
- Tabuchi A, Mori H, Kamisaka S and Hoson T. (2001). A new type of endo-xyloglucan transferase devoted to xyloglucan hydrolysis in the cell wall of azuki bean epicotyls *Plant Cell Physiol* 42:154-161
- Tahara K, Yamanoshita T, Norisada M, Hasegawa I, Kashima H, Sasaki S and Kojima K. (2008). Aluminum distribution and reactive oxygen species accumulation in root tips of two *Melaleuca* trees differing in aluminum resistance. *Plant Soil* 307:167-178.
- Takahata N and Nei M. (1985). Gene genealogy and variance of interpopulational nucleotide difference. *Genetics* 110:325-344.
- Tateoka T. (1968). Phytogeographical notes on the genus *Brachypodium* (*Poaceae*) P Beauv (Gramíneas). *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica* 12:44-56.
- Tanaka T, Antonio BA, Kikuchi S, Matsumoto T, Nagamura Y, Numa H, Sakai H, Wu J, Itoh T, Sasaki T, et al. (2008). The Rice Annotation Project Database. (RAP-DB): 2008 update. *Nucleic Acids Res* 36:1028-1033.
- Tantasawat P, Trongchuen J, Prajongjai T, Jenweerawat S, Chaowiset W. (2011). SSR analysis of soybean (*Glycine max* (L) Merr) genetic relationship and variety identification in Thailand. *Australian Journal of Crop Science* 5(3):283-290.
- Tautz D and Renz M. (1984). Simple sequences are ubiquitous repetitive components of eukaryotic genomes. *Nucleic Acids Res* 12:4127-4138.
- Taylor GJ. (1988). The physiology of aluminum phytotoxicity In: Metal ions in biological systems: Aluminum and its rule in biology, Sigel, H, and A Sigel. (eds). 24:123-163, Marcel Dekker, New York.
- Taylor GJ. (1991). Current Views of the aluminum stress response: The physiological basis of tolerance *Current Topics of Plant Biochemistry and Physiology* 10:57-93.
- Taylor GJ, McDonald-Stephens JL, Hunter DB, Bertsch PM, Elmore D, Rengel Z, Reid RJ. (2000). Direct measurement of aluminum uptake and distribution in single cells of *Chara corallina*. *Plant Physiology* 123:987-996.
- Tice KR, Parker DR, McMason DA. (1992). Operationally defined apoplastic and symplastic aluminum fractions in root tips of aluminum-intoxicated wheat. *Plant Physiol* 100:309-318.



- Trejo-Téllez LI, Stenzel R, Gómez-Merino FC and Schmitt JM. (2010). Transgenic tobacco plants overexpressing pyruvate phosphate dikinase increase exudation of organic acids and decrease accumulation of aluminum in the roots. *Plant and Soil* 326(1):187-198.
- Tovkach A, Ryan PR, Richardson AE, Lewis DC, Rathjen TM, Ramesh S, Tyerman SD, Delhaize E. (2013). Transposon mediated alteration of TaMATE1B expression in wheat confers constitutive citrate efflux from root apices. *Plant Physiol* 161:880-892.
- Thomas MR and Scott NS. (1993). Microsatellite repeats in grapevine reveal DNA polymorphisms when analyzed as sequence-tagged sites (STSs). *Theor Appl Genet* 86:985-990.
- Tsutsui T, Yamaji N and Feng MJ. (2011). Identification of a cis-acting element of *ART1*, a C2H2-type zinc-finger transcription factor for aluminum tolerance in rice. *Plant Physiol* 156: 925-931.
- Tusnády GE and I Simon. (1998). Principles governing amino acid composition of integral membrane proteins: Applications to topology prediction. *J Mol Biol* 283:489-506.
- Uozu S, Tanaka-Ueguchi M, Kitano H, Hattori K and Matsuoka M. (2000). Characterization of XET-related genes of rice. *Plant Physiol* 122:853-859.
- US DOE. (2006). Breaking the biological barriers to cellulosic ethanol: a joint research agenda DOE/SC-0095, US Department of Energy Office of Science and Office of Energy Efficiency and Renewable Energy.
- Van Buren JP. (1973). Improves firmness without additives. *Food Engineering* 45(5):127.
- Van der Merwe MJ, Osorio S, Moritz T, Nunes-Nesi A, Fernie AR. (2009). Decreased 694 mitochondrial activities of malate dehydrogenase and fumarase in tomato lead to 695 altered root growth and architecture via diverse mechanisms. *Plant Physiology* 149(696):653-669.
- Vardar F, Ismailoglu I, Inan D and Ünal M. (2011). Determination of Stress Responses Induced by Aluminum in Maize *Zea mays*. *Acta Biologica Hungarica* 62:156-170.
- Virk PS, Ford-Lloyd BV and Newbury H J. (1998). Mapping AFLP markers associated with subspecific differentiation of *Oryza sativa* (rice) and an investigation of segregation distortion. *Heredity* 81:613-620.
- Vissenberg K, Martinez-Vilchez IM, Verbelen JP, Miller JG y Fry SC. (2000). In vivo colocalization of xyloglucan endotransglycosylase activity and its donor substrate in the elongation zone of *Arabidopsis* roots. *Plant Cell* 12:1229-1237.
- Vogel JP, Tuna M, Budak H, Huo N, Gu YQ, Steinwand MA. (2009). Development of SSR markers and analysis of diversity in Turkish populations of *Brachypodium distachyon*. *BMC Plant Biology* 9:88-88.
- Vogel J, Hill T. (2008). High-efficiency *Agrobacterium*-mediated transformation of *Brachypodium distachyon* inbred line Bd21-3. *Plant Cell Reports* 27:471-478.
- Vogel J. (2008). Unique aspects of the grass cell wall. *Current Opinion in Plant Biology* 11(3):301-307.



- Vogel JP, Garvin DF, Leong O, and Hayden DM. (2006). *Agrobacterium*-mediated transformation and inbred line development in the model grass *Brachypodium distachyon*. Plant cell 84:199-211.
- Von Uexkull HR, Mutert E. (1995). Global extent, development and economic impact of acid soils. Plant and Soil 171:1-15.
- Vorwerk S. (2004). The role of plant cell wall polysaccharide composition in disease resistance. Trends Plant Sci 9:203-209.
- Wallwork MAB, Jenner CF, Logue SJ, Sedgley M. (1998). Effect of high temperature during grain-filling on the structure of developing and malted barley grains. Ann Bot 82:587-599.
- Watt M, Schneebeli K, Dong P, Wilson IW. (2009). The shoot and root growth of *Brachypodium* and its potential as a model for wheat and other cereal crops. Funct Plant Biol 36: 960-969.
- Wang Y, Stass A, Horst WJ. (2004). Apoplastic binding of aluminum is involved in silicon-induced amelioration of aluminum toxicity in maize. Plant Physiol 136:3762-3770.
- Wang J, Raman H, Zhou M, Ryan PR, Delhaize E, Hebb DM, Coombes N, Mendham N. (2007). High-resolution mapping of the Alp locus and identification of a candidate gene *HvMATE* controlling aluminium tolerance in barley *Hordeum vulgare* L. Theor Appl Genet 115:265-276.
- Wang Q F, Zhao Y, Yi Q, Li K Z, Yu Y X and Chen L M. (2010). Overexpression of malate dehydrogenase in transgenic tobacco leaves: enhanced malate synthesis and augmented Alresistance. Acta Physiologiae Plantarum 32(6):1209-1220.
- Wolny E, Hasterok R. (2009). Comparative cytogenetic analysis of the genomes of the model grass *Brachypodium distachyon* and its close relatives. Annals of Botany 104:873-881.
- Wu P, Liao CY, Hu B, Yi KK, Jin WZ, Ni JJ, He C. (2000). *QTLs* and epistasis for aluminum tolerance in rice. (*Oryza sativa* L). at different seedling stages. Theor Appl Genet 100:1295-1303.
- Wu X, Wu J, Luo Y, Bragg J, Anderson O, Vogel J and Gu YQ. (2013). Phylogenetic, molecular, and biochemical characterization of caffeic acid O-methyltransferase gene family in *Brachypodium distachyon*. Int J Plant Genomics 2013:12.
- Xia JX, Yamaji N, Kasai T, Ma JF. (2010). Plasma membrane localized transporter for aluminum in rice. Proc Natl Acad Sci USA 107:18381-18385.
- Xia JX, Yamaji N, Ma JF. (2013). A plasma membrane-localized small peptide is involved in rice aluminum tolerance. Plant J 76:345-355.
- Xu W, Purugganan MM, Polisensky DH, Antosiewicz DM, Fry SC and Braam J. (1995). *Arabidopsis* TCH4, regulated by hormones and the environment, encodes a xyloglucan endotransglycosylase. Plant Cell 7:1555-1567.
- Xu W, Campbell P, Vargheese AK and Braam J. (1996). The *Arabidopsis* XET-related gene family: environmental and hormonal regulation of expression. Plant J 9:879-889.
- Yamaji N, Huang C, Nagao S, Yano M, Sato Y, et al. (2009). A zinc finger transcription factor ART1 regulates multiple genes implicated in aluminum tolerance in rice. The Plant Cell 21:3339-3349.



- Yamamoto Y, Kobayashi Y, Devi SR, Rikiishi S and Matsumoto H. (2003). Oxidative stress triggered by aluminum in plant roots. *Plant Soil* 255:239-243.
- Yamamoto Y, Kobayashi Y, Devi SR, Rikiishi S, Matsumoto H. (2002). Aluminum toxicity is associated with mitochondrial dysfunction and the production of reactive oxygen species in plant cells. *Plant Physiol* 128:63-72.
- Yamamoto Y, Kobayashi Y, Matsumoto H. (2001). Lipid peroxidation is an early symptom triggered by aluminium, but not the primary cause of elongation inhibition in pea roots. *Plant Physiol* 125:199-208.
- Yamaguchi M, Sasaki T, Sivaguru M et al. (2005). Evidence for the plasma membrane localization of Al-activated malate transporter ALMT1. *Plant and Cell Physiology* 46(5):812-816.
- Yang JL, Zhu XF, Peng YX, Zheng C, Li GX, Liu Y, Zheng SJ. (2011). Cell wall hemicellulose contributes significantly to Al adsorption and root growth in Arabidopsis. *Plant Physiology* 155:1885-1892.
- Yang JL, Zhu X F, Peng YX, Zheng C, Ming F, and Zheng SJ. (2011b). Aluminum regulates oxalate secretion and plasma membrane H⁺-ATPase activity independently in tomato roots. *Planta* 234(2):281-291.
- Yang XY, Yang JL, Zhou YA, et al. (2011c). A de novo synthesis citrate transporter, *Vigna umbellata* multidrug and toxic compound extrusion, implicates in Al-activated citrate efflux in rice bean (*Vigna umbellata*) root apex. *Plant Cell & Environment* 34(12):2138-2148.
- Yang LT, Jiang HX, Tang N, and Chen LS. (2011d). Mechanisms of aluminum-tolerance in two species of citrus: secretion of organic acid anions and immobilization of aluminum by phosphorus in roots. *Plant Science* 180(3):521-530.
- Yang JL, Zheng SJ, He YF, and Matsumoto H. (2005). Aluminium resistance requires resistance to acid stress: a case study with spinach that exudes oxalate rapidly when exposed to Al stress. *Journal of Experimental Botany* 56(414):1197-1203.
- Yang JL, Zhang L, Li YY, You JF, Wu P, and Zheng SJ. (2006). Citrate transporters play a critical role in aluminium stimulated citrate efflux in rice bean *Vigna umbellata* roots. *Annals of Botany* 97(4):579-584.
- Yang ZM, Yang H, Wang J and Wang YS. (2004). Aluminum regulation of citrate metabolism for Al-induced citrate efflux in the roots of *Cassia tora* L. *Plant Science* 166(6):1589-1594.
- Yang ZM, Nian H, Sivaguru M, Tanakamaru S and Matsumoto H. (2001). Characterization of aluminium-induced citrate secretion in aluminium-tolerant soybean *Glycine max* plants. *Physiologia Plantarum* 113(1):64-71.
- Yang LT, Jiang HX, Qi YP and Chen LS. (2012). Differential expression of genes involved in alternative glycolytic pathways, phosphorus scavenging and recycling in response to aluminum and phosphorus interactions in citrus roots. *Molecular Biology Reports* 39(5):6353-6366.
- Yang JL, Zhang L and Zheng SJ. (2008). Aluminum-activated oxalate secretion does not associate with internal content among some oxalate accumulators. *Journal of Integrative Plant Biology* 50(9):1103-1107.



- Yang JL, Li YY, Zhang YJ, Zhang SS, Wu YR, Wu P and Zheng SJ. (2008b). Cell wall polysaccharides are specifically involved in the exclusion of aluminum from the rice root apex. *Plant Physiology* 146:602-611.
- Yang ZM, Sivaguru M, Horst WJ, and Matsumoto H. (2000). Aluminium tolerance is achieved by exudation of citric acid from roots of soybean *Glycine max*. *Physiologia Plantarum* 110(1):72-77.
- Yang, LT, Qi, YP, Jiang, HX and Chen LS. (2013). Roles of organic acid anion secretion in aluminium tolerance of higher plants. *BioMed research international* 2013:173682 <http://dxdoiorg/101155/2013/173682>.
- Yap IV and Nelson BJ. (1996). WinBoot: a program for performing bootstrap analysis of binary data determine the confidence limits of UPGMA-based dendrograms. *Int Rice Res Inst (IRRI)* 1-22.
- Yaroshevsky AA. (2006). Abundances of chemical elements in the Earth's crust. *Geochemistry International* 44:48-55.
- Yin L, Mano J, Wang S, Tsuji W, Tanaka K. (2010). The involvement of lipid peroxide-derived aldehydes in aluminum toxicity of tobacco roots. *Plant Physiol* 152:1406-1417.
- Yokoyama R and Nishitani K. (2001). A comprehensive expression analysis of all members of a gene family encoding cell-wall enzymes allowed us to predict cis-regulatory regions involved in cell-wall construction in specific organs of *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiol* 42:1025-1033.
- Yokosho K, Yamaji N, Ma JF. (2010). Isolation and characterization of two *MATE* genes in rye. *Functional Plant Biology* 37:296-303.
- Yokosho K, Yamaji N, Ma JF. (2011). An Al-inducible *MATE* gene is involved in external detoxification of Al in rice. *Plant J* 68:1061-1069.
- Yokoyama R and Nishitani KA. (2001). comprehensive expression analysis of all members of a gene family encoding cell-wall enzymes allowed us to predict cis-regulatory regions involved in cell-wall construction in specific organs of *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiol* 42:1025-33.
- You JF, Hou NN, Xu MY, Zhang HM and Yang ZM. (2010). Citrate transporters play an important role in regulating aluminum-induced citrate secretion in *Glycine max*. *Biologia Plantarum* 54(4):766-768.
- Zhang GC, Slaski JJ, Archambault DJ and Taylor GJ. (1997). Alteration of plasma membrane lipids in aluminum resistant and aluminum sensitive wheat genotypes in response to aluminum stress. *Physiol Plant* 99:302-308.
- Zhang WH, Ryan PR, and Tyerman SD. (2001). Malate-permeable channels and cation channels activated by aluminum in the apical cells of wheat roots. *Plant Physiology* 125(3):1459-1472.
- Zhang H, Zhang S, Mang Q, Zou J, Jiang W, Liu D. (2009). Effects of aluminum on nucleoli in root tip cells, root growth and the antioxidant defense system in *Vicia faba* L. *Acta Biol Crac Ser Bot* 52:99-106.
- Zhao Z, Ma JF, Sato K and Takeda K. (2003). Differential Al resistance and citrate secretion in barley *Hordeum vulgare* L. *Planta* 217(5):794-800.
- Zheng SJ, Ma JF and Matsumoto H. (1998). High aluminum resistance in buckwheat I Al-induced specific secretion of oxalic acid from root tips. *Plant Physiol* 117:745-751.



- Zhou GF, Delhaize E, Zhou M, Ryan PR. (2013). The barley MATE gene, *HvAACT1*, increases citrate efflux and Al tolerance when expressed in wheat and barley. *Ann Bot* 112:603-612.
- Zietkiewicz E, Rafalski A and Labuda D. (1994). Genome fingerprinting by simple sequence repeat. (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics* 20:176-183.



IX. ANEXOS

Anexo 1: Promedio del recrecimiento de la raíz (mm) con diferentes tratamientos de Al, sin Al y con Al (10 μ M). Los valores son el promedio de 16 plantas de tres replicas distintas.

Línea	Ploidía	Concentración de Al		Porcentaje de recrecimiento relativo de la raíz (%) (*)
		0 μ M	10 μ M	
		Promedio (mm)	Promedio (mm)	
ABR8	2n=2x=10	15 \pm 1	11 \pm 3	26
ABR1	2n=2x=10	17 \pm 2	2 \pm 2	88
ABR9	2n=2x=10	5 \pm 1	0.7 \pm 0.7	86
Bd21	2n=2x=10	15 \pm 3	1 \pm 2	93
E10	2n=2x=10	8 \pm 2	0.1 \pm 0.1	98
ABR6	2n=2x=10	23 \pm 2	1 \pm 1	95
M2	2n=4x=30	14 \pm 2	14 \pm 1	0
M15	2n=4x=30	23 \pm 4	19 \pm 4	17
M10	2n=4x=30	16 \pm 3	12 \pm 4	25
HP	2n=4x=30	20 \pm 4	17 \pm 4	15
CB	2n=4x=30	23 \pm 5	18 \pm 5	21
M12	2n=4x=30	25 \pm 3	6 \pm 1	77
M11	2n=4x=30	27 \pm 5	5 \pm 2	81
E82	2n=4x=30	10 \pm 2	1.5 \pm 1.5	85
GRA788	2n=4x=30	12 \pm 3	0.2 \pm 0.2	98
E80	2n=4x=30	9 \pm 02	0.1 \pm 0.1	98
E78	2n=4x=30	6 \pm 1	0.6 \pm 0.6	90

(*) Porcentaje de inhibición del recrecimiento de la raíz= ((Promedio de Sin Al – Promedio de con Al)/ Promedio de Sin Al)x100

Anexo 2: Tratamiento con el reactivo de Schiff en *Brachypodium*



Observaciones: Ápices de raíces teñidas con el reactivo de Schiff en varias líneas y ecotipos del género *Brachypodium* expuestos a 20 μM $\text{AlK}(\text{SO}_4)_2$ for 24 h. Hay tres o dos ápices de raíz por línea o ecotipo

ANEXO 3: Secuencias completas de los genes *BdALMT1* de las líneas *Bh* diploides Bd21, ABR1 y ABR8, y el gen *BsALMT1* de la línea *Bs* diploide E66. Los nucleótidos destacados en gris son los exones y sin destacar los intrones.

	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120	130	140
Bd21	ATGGAGGTTGATCACCAGAT	---	CAGAGTGAGCAACGACGGCGCCGATGGAGACC	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
ABR1	ATGGAGGTTGATCACCAGAT	---	CAGAGTGAGCAACGACGGCGCCGATGGAGACC	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
ABR8	ATGGAGGTTGATCACCAGAT	---	CAGAGTGAGCAACGACGGCGCCGTTGGAGACC	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
E66	ATGGAGGTTGATCACCAGATATCCAGCGTGAGCAGCGAAGGCGCCGATGGAGACCACACGGCCGGGCATCATGGCGCTGTCCGCGTCTTCCTTCGCGGGTCTCTGGCTGATGCTCCGCTCGTTGATCCTCGGGCTCTGGTG													
	150	160	170	180	190	200	210	220	230	240	250	260	270	280
Bd21	CCGTGTGCGCCGGGTTTCGCGAGGAAAGTGGGGAGGATCGCTCGGGAGGACCCGAGGCGAGTGGCACACTCCTTCAAGGTGGGGCTGGCGCTCACGCTGGTGTCCGTGCTCTACTACGTACAGCCGCTCTTCAAGGGCTTCG													
ABR1	CCGTGTGCGCCGGGTTTCGCGAGGAAAGTGGGGAGGATCGCTCGGGAGGACCCGAGGCGAGTGGCACACTCCTTCAAGGTGGGGCTGGCGCTCACGCTGGTGTCCGTGCTCTACTACGTACAGCCGCTCTTCAAGGGCTTCG													
ABR8	CCGTGTGCGCCGGGTTTCGCGAGGAAAGTGGGGAGGATCGCTCGGGAGGACCCGAGGCGAGTGGCACACTCCTTCAAGGTGGGGCTGGCGCTCACGCTGGTGTCCGTGCTCTACTACGTACAGCCGCTCTTCAAGGGCTTCG													
E66	CCGTGTGCGCCGGGTTTCGCGAGGAAAGTGGGGAGGATCGCGAGGAGGACCCGAGGCGAGTGGCGCACTCCTTCAAGGTGGGGCTGGCGCTCACGCTGGTGTCCGTGCTCTACTACGTACAGCCGCTCTTCAAGGGCTTCG													
	290	300	310	320	330	340	350	360	370	380	390	400	410	420
Bd21	GGGTCTCCACGCTCTGGGCCGTGCTCACCGTCGTCGTCGTCATGGAGTACACCGTCGGCGGCACGCTCAGCAAAGGCTTGAACAGGGCCTTCGCCACGCTCGTGGCTGGGTTTCATCGCCGTCCGAGCTCATCAGGTGGCT													
ABR1	GGGTCTCCACGCTCTGGGCCGTGCTCACCGTCGTCGTCGTCATGGAGTACACCGTCGGCGGCACGCTCAGCAAAGGCTTGAACAGGGCCTTCGCCACGCTCGTGGCTGGGTTTCATCGCCGTCCGAGCTCATCAGGTGGCT													
ABR8	GGGTCTCCACGCTCTGGGCCGTGCTCACCGTCGTCGTCGTCATGGAGTACACCGTCGGCGGCACGCTCAGCAAAGGCTTGAACAGGGCCTTCGCCACGCTCGTGGCTGGGTTTCATCGCCGTCCGAGCTCATCAGGTGGCT													
E66	GGGTCTCCACCGCTCTGGGCCGTGCTCACCGTCGTCGTCGTCATGGAGTACACCGTCGGCGGCACGCTCAGCAAAGGCTTGAACAGGGCCTTGAACAGGGCCTTCGCCACGCTCGTGGCTGGGTTTCATCGCCGTCCGAGCTCATCAGGTGGCC													
	430	440	450	460	470	480	490	500	510	520	530	540	550	560
Bd21	AACCGCTGTGGCAGCGAGGGGGAAACCCATAAATACTCGCCGCTTCGTTCTTTGTAGGTAAAGCCAGACGCACATATTAATACGGCATATATTTTGAGACGGAGAGATATATAAGATGCGCCTACATTACCAAACTCGA													
ABR1	AACCGCTGTGGCAGCGAGGGGGAAACCCATAAATACTCGCCGCTTCGTTCTTTGTAGGTAAAGCCAGACGCACATATTAATAC	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
ABR8	AACCGCTGTGGCAGCGAGGGGGAAACCCATAAATACTCGCCGCTTCGTTCTTTGTAGGTAAAGCCAGACGCACATATTAATACGGCATATATTTTGAGACGGAGAGATATATAAGATGCGCCTACATTACCAAACTCGA													
E66	AACCGCTGTGGCAGCGAGGGGGAAACCCATAATGTCGCCGCTTCGTTCTTTGTAGGTAAAGCCAGACGCACATATTAATACGGCATATATTTTGAGACGGAGAGATATATAAGATGCGCCTACATTACCAAACTCGA													
	570	580	590	600	610	620	630	640	650	660	670	680	690	700
Bd21	ATT-GA-ACTGGGTGACGTTTCATC-TCTGTGGCAGCGTCCGCGGCGACGTTCTCACGCTTCATCCCCGAGATCAAGGCCAAGTAGCAGCTACGGGGTGACCATATTCATACCTTTAGCCTGGTGGCCGTGTCGA													
ABR1	ATT-GA-ACTGGGTGACGTTTCATC-TCTGTGGCAGCGTCCGCGGCGACGTTCTCACGCTTCATCCCCGAGATCAAGGCCAAGTAGCAGCTACGGGGTGACCATATTCATACCTTTAGCCTGGTGGCCGTGTCGA													
ABR8	ATT-GA-ACTGGGTGACGTTTCATC-TCTGTGGCAGCGTCCGCGGCGACGTTCTCACGCTTCATCCCCGAGATCAAGGCCAAGTAGCAGCTACGGGGTGACCATATTCATACCTTTAGCCTGGTGGCCGTGTCGA													
E66	ATTTTGATCAGTGGTGTGCGTTCTTCTATTTCATGGCAGCGTCCGCGGCGACGTTCTCTCGCTTCATCCCCGAGATCAAGGCCAAGTAGCAGCTACGGGGTGACCATATTCATACCTTTAGCCTGGTGGCCGTGTCGA													
	710	720	730	740	750	760	770	780	790	800	810	820	830	840
Bd21	GCTACCGCGTGGAGGAGCTCATCCAGCTCGCACACGAGCGGTTCTCCACCATCGTCTGGGGGTCTTTCACATGCCCTCTGCACCACTATCTTCGCTCTTCCCCGCTCTGGGCAGGCGAGGACCTCCACAAGCTCTCCGCCGGT													
ABR1	GCTACCGCGTGGAGGAGCTCATCCAGCTCGCACACGAGCGGTTCTCCACCATCGTCTGGGGGTCTTTCACATGCCCTCTGCACCACTATCTTCGCTCTTCCCCGCTCTGGGCAGGCGAGGACCTCCACAAGCTCTCCGCCGGT													
ABR8	GCTACCGCGTGGAGGAGCTCATCCAGCTCGCACACGAGCGGTTCTCCACCATCGTCTGGGGGTCTTTCACATGCCCTCTGCACCACTATCTTCGCTCTTCCCCGCTCTGGGCAGGCGAGGACCTCCACAAGCTCTCCGCCGGT													
E66	GCTACCGCGTGGAGGAGCTCATCCAGCTCGCGCACACGAGGATTCTCCACCATCGTCTGGGGGTCTTTCACATGCCCTCTGCACCACTATCTTCGCTCTTCCCCGCTCTGGGCCGCGGAGGACCTCCACAAGCTCTCCGCCGGT													
	850	860	870	880	890	900	910	920	930	940	950	960	970	980
Bd21	AACCTCGACAAGCTGGCCAGTTCTTTGAAGGTACGTACGTAGTAC	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
ABR1	AACCTCGACAAGCTGGCCAGTTCTTTGAAGGTACGTACGTAGTAC	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
ABR8	AACCTCGACAAGCTGGCCAGTTCTTTGAAGGTACGTACGTAGTAC	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
E66	AACCTCGACAAGCTGGCCAGTTCTTTGAAGGTGCGTACGTAATATGCAAAAGTCGACAGGAATCGGTTAGGGGCTCTCAGTCGATGTGTTTCTGCCGTCCATATGCATGCATCCCAATATTTGGTGACAAAGATTCTCT													
	990	1000	1010	1020	1030	1040	1050	1060	1070	1080	1090	1100	1110	1120

```

....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
Bd21  GCACTTTTTT -GTGCCATACTGGTTCAAGTCATGATATTATAA CTTTGTAGACTATAC TAATGCAACTTGAAGCGGGGTAAGACTCAAATACAAGTTAGCCTTGTAAGTTCTGCGGGGGGAATGTGGGGCAACAATA
ABR1  GCACTTTTTT -GTGCCATACTGGTTCAAGTCATGATATTATAA CTTTGTAGACTATAC TAATGCAACTTGAAGCGGGGTAAGACTCAAATACAAGTTAGCCTTGTAAGTTCTGCGGGGGGAATGTGGGGCAACAATA
ABR8  GCACTTTTTT -GTGCCATACTGGTTCAAGTCATGATATTATAA CTTTGTAGACTATAC TGATGCAACTTGAAGCGGGGTAAGACTCAAATACAAGTTAGCCTTGTAAGTTCTGCGGGGGGAATGTGGGGCAACAATA
E66   GCACTTTTTTGTGCATACCTGATTAGGCTAATAC TATTATAA CTTTGTAGACTACACTAATGCAACTTGAAGTGAAGGATAGCCTCAAATACAAGACAGGCATGTGAACCTT---GGGAAAAATGGGGAAACAAGAAATA
      1130      1140      1150      1160      1170      1180      1190      1200      1210      1220      1230      1240      1250      1260
....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
Bd21  ATAGCAGACTCTTCCTGACCAGAGTCACCAGATATACTCTGTTTTATAGTTCTTCCAG---CCTCTTTGTAGCAGCTTCATATTGATA--GGCTTTTCGCTTCATATTGGTACACTGTC-ACATGAATCTGGGCCAA
ABR1  ATAGCAGACTCTTCCTGACCAGAGTCACCAGATATACTCTGTTTTATAGTTCTTCCAG---CCTCTTTGTAGCAGCTTCATATTGATA--GGCTTTTCGCTTCATATTGGTACACTGTC-ACATGAATCTGGGCCAA
ABR8  ATAGCAGACTCTTCCTGACCAGAGTCACCAGATATACTCTGTTTTATAGTTCTTCCAG---CCTCTTTGTAGCAGCTTCATATTGATA--GGCTTTTCGCTTCATATTGGTACACTGTC-ACATGAATCTGGGCCAA
E66   GTAGTGAACTCTTCCTGACCAGAGTCACCACACATGCTCTGTTTTATAGCTCTTCCAGTCCAGCCTCTCCGTAGCAGTTTCAATTGATACAGTGTTCCTTCACTGTTACACTGGTACACTGTCCACATGAAGCTGG--CAT
      1270      1280      1290      1300      1310      1320      1330      1340      1350      1360      1370      1380      1390      1400
....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
Bd21  AAAAAATTGCAGACAAACATTTGTTGATATCATAGGAGACCAATAGACTGCCTTGGAATGGCACCAGCCTACTCTGCAAAACAAAATTAGGGATCCCCAAAAATTTATTCGAAAAAGAGGGACATTTGAAGTGAAAAAT-AAGTA
ABR1  AAAAAATTGCAGACAAACATTTGTTGATATCATAGGAGACCAATAGACTGCCTTGGAATGGCACCAGCCTACTCTGCAAAACAAAATTAGGGATCCCCAAAAATTTATTCGAAAAAGAGGGACATTTGAAGTGAAAAAT-AAGTA
ABR8  AAAAAATTGCAGACAAACATTTGTTGATATCATAGGAGACCAATAGACTGCCTTGGAATGGCACCAGCCTACTCTGCAAAACAAAATTAGGGATCCCCAAAAATTTATTCGAAAAAGAGGGACATTTGAAGTGAAAAAT-AAGTA
E66   AAAAAATGCAGACAA-CATTTGTTCAAAAATAGA-----GACCCGACCTACTCTGCAAAACAAAATTAGGGAAACCCAAAAAATATTCGAAAAAGAGGAACCTTTTGAAGTGAAAAATTAAGTA
      1410      1420      1430      1440      1450      1460      1470      1480      1490      1500      1510      1520      1530      1540
....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
Bd21  AACTTTCATGTACTTTGTAGAGTTAGTTACTCACGTAGACTTTCACAGTTACTCCAGAGTTTGTGAGGTGGAAGTGTGCACATGCATGCAGGGATGGAATCTGAATGCTTTGGAGAAAACTCTACAAATTGAGAAATTTGG
ABR1  AACTTTCATGTACTTTGTAGAGTTAGTTACTCACGTAGACTTTCACAGTTACTCCAGAGTTTGTGAGGTGGAAGTGTGCACATGCATGCAGGGATGGAATCTGAATGCTTTGGAGAAAACTCTACAAATTGAGAAATTTGG
ABR8  AACTTTCATGTACTTTGTAGAGTTAGTTACTCACGTAGACTTTCACAGTTACTCCAGAGTTTGTGAGGTGGAAGTGTGCACATGCATGCAGGGATGGAATCTGAATGCTTTGGAGAAAACTCTACAAATTGAGAAATTTGG
E66   AACTTTCATGTACTTCTAGAGTTAGTTACT--TG TAGACTTCACTCCTTACTCCAGTGTGTGAGGTGGAAGTGTACACATGGATGCAGGGATGGAATCTGAATGCTTTGGAGAAAACTCTGCAATTGAGAAATTTGG
      1550      1560      1570      1580      1590      1600      1610      1620      1630      1640      1650      1660      1670      1680
....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
Bd21  AGAGTAAACCTTTCTCCAAGTGTACAAGAGCGTCTCTCAATTCGAAGGCCACTGAGGACTCTCTGGTAAGCATCCTTTTACAAATGATACACCGTATGCTGAGTGCAGAAAACTCCAGTAAACATCTGTCAGAGAAGGAAAGC
ABR1  AGAGTAAACCTTTCTCCAAGTGTACAAGAGCGTCTCTCAATTCGAAGGCCACTGAGGACTCTCTGGTAAGCATCCTTTTACAAATGATACACCGTATGCTGAGTGCAGAAAACTCCAGTAAACATCTGTCAGAGAAGGAAAGC
ABR8  AGAGTAAACCTTTCTCCAAGTGTACAAGAGCGTCTCTCAATTCGAAGGCCACTGAGGACTCTCTGGTAAGCATACCTTTTACAAATGATACACCGTATGCTGAGTGCAGAAAACTCCAGTAAACATCTGTCAGAGAAGGAAAGC
E66   AGAGTAAACCTTTCTCCAAGTGTACAAGAGCGTCTCTCAATTCGAAGGCCACTGAGGACTCTCTGGTAAGCTTCCCTTTACAAATGATACACCGTATGCTGAGTGTGAAGCTCCAATAAACATCAGCAGAAAAAGAAAGC
      1690      1700      1710      1720      1730      1740      1750      1760      1770      1780      1790      1800      1810      1820
....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
Bd21  TTGTATACACAGCAGTTCCTTTTTGTAATGGT--ATTCCAAAACCTGCAGTGCATTTTCCCAAGTGGGAGCCAGGTCATGGTAAATTCGGCTTCCGACACCCATGGAGCCCAATACCAGAAGATCGGAGCTCTTTGTGCGCC
ABR1  TTGTATACACAGCAGTTCCTTTTTGTAATGGT--ATTCCAAAACCTGCAGTGCATTTTCCCAAGTGGGAGCCAGGTCATGGTAAATTCGGCTTCCGACACCCATGGAGCCCAATACCAGAAGATCGGAGCTCTTTGTGCGCC
ABR8  TTGTATACACAGCAGTTCCTTTTTGTAATGGT--ATTCCAAAACCTGCAGTGCATTTTCCCAAGTGGGAGCCAGGTCATGGTAAATTCGGCTTCCGACACCCATGGAGCCCAATACCAGAAGATCGGAGCTCTTTGTGCGCC
E66   TTTTATACACAGCAGTTCCTTTTTGTCTACGGTTTATTCCAAAACCTGCATGCAATTTTCCCAAGTGGGAGCCAGGTCATGGTAAATTCGGCTTCCGGCACCCATGGAGCCCAATACCAGAAGCTTGGAGCTCTTTGTGCGCC
      1830      1840      1850      1860      1870      1880      1890      1900      1910      1920      1930      1940      1950      1960
....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
Bd21  AGTGTGCGTCTTCCATGGAGGCTCTTGCTTCCCTATGTCATCACACTCCAAAAATCTCAGGTAATTGGAACTTCTCCCCCTTTTCTGGCCAAAAAGACCATGGAGCCAGGTTTTGACCAACATCATTTTCTGATCAACAGT
ABR1  AGTGTGCGTCTTCCATGGAGGCTCTTGCTTCCCTATGTCATCACACTCCAAAAATCTCAGGTAATTGGAACTTCTCCCCCTTTTCTGGCCAAAAAGACCATGGAGCCAGGTTTTGACCAACATCATTTTCTGATCAACAGT
ABR8  AGTGTGCGTCTTCCATGGAGGCTCTTGCTTCCCTATGTCATCACACTCCAAAAATCTCAGGTAATTGGAACTTCTCCCCCTTTTCTGGCCAAAAAGACCATGGAGCCAGGTTTTGACCAACATCATTTTCTGATCAACAGT
E66   AGTGCGCATCTTCCATGGAGGCTCTCGCTTCCCTATGTCATCACACTCCAAAAATCTCAGGTAATTGGAAATTTCTTCCCTTTTCATGAACAAAAAGACCATGGAGCCAGAT---ACCAACAACTTTTCTGATCAACAGT
      1970      1980      1990      2000      2010      2020      2030      2040      2050      2060      2070      2080      2090      2100
....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
Bd21  ACCCTGAAGCAAAATCCAGAGCTATCCTTGAAGGTTTGAACAGCATGCAGTGAAATGAGCTCGGACTCTGCCAAGGCGCTCAGGGAGCTCTCGACAGCAATTCGAACGATGACTGTACCATCCCCAGCCAACATCACCATG
ABR1  ACCCTGAAGCAAAATCCAGAGCTATCCTTGAAGGTTTGAACAGCATGCAGTGAAATGAGCTCGGACTCTGCCAAGGCGCTCAGGGAGCTCTCGACAGCAATTCGAACGATGACTGTACCATCCCCAGCCAACATCACCATG
ABR8  ACCCTGAAGCAAAATCCAGAGCTATCCTTGAAGGTTTGAACAGCATGCAGTGAAATGAGCTCGGACTCTGCCAAGGCGCTCAGGGAGCTCTCGACAGCAATTCGAACGATGACTGTACCATCCCCAGCCAACATCACCATG
E66   ACCCTGAAGCAAAATCCAGAGCTATCCTTGAAGGTTTGAACGGCATGCGGAGAAATGAGCTCGGACTCTGTCAAGGCGCTCAGGGAGCTCTCGACAGCAATTCGAACGATGACTGTACCATCCCCAGCCAACATCACCATG
      2110      2120      2130      2140      2150      2160      2170      2180      2190      2200      2210      2220      2230      2240
....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|

```

Bd21 TCTGCAGCCATCACAGTTGCGAAAGGCCTCAGAAGTGAAATTATCACAGGATATGGCTCTGCTGCAAGTGATGCATGTAGCTGTTACTGCAACACTTCTCTCGGACTTGGTTACAACAATAAGAAAAATTGCAGAACTCTGT
 ABR1 TCTGCAGCCATCACAGTTGCGAAAGGCCTCAGAAGTGAAATTATCACAGGATATGGCTCTGCTGCAAGTGATGCATGTAGCTGTTACTGCAACACTTCTCTCGGACTTGGTTACAACAATAAGAAAAATTGCAGAACTCTGT
 ABR8 TCTGCAGCCATCACAGTTGCGAAAGGCCTCAGAAGTGAAATTATCACAGGATATGGCTCTGCTGCAAGTGATGCATGTAGCTGTTACTGCAACACTTCTCTCGGACTTGGTTACAACAATAAGAAAAATTGCAGAACTCTGT
 E66 TCTGCAGCCATCAAAGTTGCGAAAGGCCTCAGAAGTGAAATTATCACAGGATATGGCTCTCCTGCAAGTGATGCATGTAGCTGTTACTGCAACACTTCTCTCGGACTTGGTTACAACAATAAGAAAGATTGCAGAACTCCGT

2250 2260 2270 2280 2290 2300 2310
|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....
 Bd21 TGATAATCTAGCGCGACTTGCCCACTTCAAAACCCCTGAAAAATCCAAAAAGATGTTGTTATCAACATTGCGAGTTGA
 ABR1 TGATAATCTAGCGCGACTTGCCCACTTCAAAACCCCTGAAAAATCCAAAAAGATGTTGTTATCAACATTGCGAGTTGA
 ABR8 TGATAATCTAGCGCGACTTGCCCACTTCAAAACCCCTGAAAAATCCAAAAAGATGTTGTTATCAACATTGCGAGTTGA
 E66 TGATAATCTAGCGCTACTTGCGCACTTCAAAACCCCTGAAAAAACAAGATGTTGTTATCAACATTGCGAGATGA

Anexo 4: Alineamiento de las secuencias de nucleótidos de las regiones “upstream” del gen *ALMT1* (Región B) de las líneas diploides *Bd* sensibles Bd21, ABR1 y la tolerante ABR8, y de la línea sensible diploide *Bs* E66. Se indica destacado en gris el triplete de inicio (ATG).

Bd21	1	TGTCGGGGAATAGATCGGAGAAAGGCGAAATAAACGGCGCCGGGGCCTTTGGCTAGTGCT-
ABR1	1	TGTCGGGGAATAGATCGGAGAAAGGCGAAATAAACGACGCCGGGGCCTTTGGCTAGTGCT-
ABR8	1	TGTCGGGGAATAGATCGGAGAAAGGCGAAATAAACGGAGGCCGGGGCCTTTGGCTAGATCT-
E66	1	TGTCGGGGAATAGATCGGAGAAAGGCGAAATAAACGGCGCCGGGGCCTTTGGCTAGTGCTG
Bd21	60	-----CTGTTGTTGTACA---TGCCTGCAAGCTGTTTCACGAAG
ABR1	60	-----CTGTTGTTGTACA---TGCCTGCAAGCTGTTTCACGAAG
ABR8	60	-----CTGTTGTTGTACA---TGCCTGCAAGCTGTTTCACGAAG
E66	61	CTCCTTACTGTACTGCTTGTGCAGTTGTTGTACAATGCGTGTGCAAGCTGTTTCACGAAG
Bd21	96	GTCTTAGTGGCTGAGCAATAGGGTGTGGAACTGTACTTCGGTTCACTTGCAGAGTTGCA
ABR1	96	GTCTTAGTGGCTGAGCAATAGGGTGTGGAACTGTACTTCGGTTCACTTGCAGAGTTGCA
ABR8	96	GTCTTAGTGGCTGAGCAATAGGGTGTGGAACTGTACTTCGGTTCACTTGCAGAGTTGCA
E66	121	GTCTTAGTGGCTGAGCAATAGGGTGTGGAACTGTACTTCGGTTCACTTGCAGAGTTGCA
Bd21	156	GTGATTCTTGCTAGCATCTAGCTGCATGCACGAA--GAAT-----CAGTCATGAATT
ABR1	156	GTGATTCTTGCTAGCATCTAGCTGCATGCACGAA--GAAT-----CAGTCATGAATT
ABR8	156	GTGATTCTAGCTAGCATCTAGCTGCATGCACGAA--GAAT-----CAGTCATGAATT
E66	181	GTGATTCTAGCTAGCATCTAGCTGCATGCACGAATTGAAGAAGCTTAGCAGTCGTGAATT
Bd21	206	GAGCGAGAGAACCGCTGTAGTGCACTCAGCCGGATAATACATAGTGCTGCGTCGT-----
ABR1	206	GAGCGAGAGAACCGCTGTAGTGCACTCAGCCGGATAATACATAGTGCTGCGTCGT-----
ABR8	206	GAGCGAGAGAACCGCTGTAGTGCACTCAGCCGGATAATACATAGTGCTGCGTCGT-----
E66	241	GAGTGAGAGAACCGCTGTAGTGCAATCAGCCGGAATAATGAGAGTGCTGCGTCGTGAAGC
Bd21	261	-----CTCTGAACTCTGAA--CCATTGC
ABR1	261	-----CTCTGAACTCTGAAAACCATTGC
ABR8	261	-----TTCTGAACTCTGAAAACCATTGC
E66	301	TGTGCTGCAGTGTTGCAGAGGTCTCCCGGCTTCTCGTCTCCGAACTCTGAAAACCATTGC
Bd21	282	AATCAATCTGTGCATAC--ACGGGTCTTCTTCCACCTGAGACGGTGACTGGTAATTAAC
ABR1	284	AATCAATCTGTGCATAC--ACGGGTCTTCTTCCACCTGAGACGGTGACTGGTAATTAAC
ABR8	284	AATCAATCTGTGCATAC--ACGGGTCTTCTTCCACCTGAGACGGTGACTGGTAATTAAC
E66	361	AATCAATCTGTGGATACGTACGGATCTTCTTCCACCTGAGACGGTGACTGGTAATTAA-T
Bd21	340	GGTTGAGTACATGAGATGTGCGGGAGATTCCGTGCAGAAACAAACGAAATCAAAGCAGCG
ABR1	342	GGTTGAGTACATGAGATGTGCGGGAGATTCCGTGCAGAAACAAACGAAATCAAAGCAGCG
ABR8	342	GGTTGAGTACATGAGATGTGCGGGAGATTCCGTGCAGAAACAAACGAAATCAAAGCAGCG
E66	420	GGTTGAGTACATGAGATGCGTGGGAATTTCTGTGCAGAAACAAAC-AAATCAAAGCAGCG
Bd21	400	GTCAGCTGCAGTTGAACCCCTTGAACGGTGGAAGGAAGAAGTTTACTAGGGATGACAAGA
ABR1	402	GTCAGCTGCAGTTGAACCCCTTGAACGGTGGAAGGAAGAAGTTTACTAGGGATGACAAGA
ABR8	402	GTCAGCTGCAGTTGAACCCCTTGAACGGTGGAAGGAAGAAGTTTACTAGGGATGACAAGA
E66	479	GTCAGCTGCAGTTGAACC-TTGAACGGTGGAAGCAAGGAGTTTACTAGGGATGACAAGA

Bd21 460 CGATATGTAGATCCGTCCACATGCATTGAACAAGCATTTCATAACATTTTGGGCTGCGAAA
 ABR1 462 CGATATGTAGATCCGTCCACATGCATTGAACAAGCATTTCATAACATTTTGGGCTGCGAAA
 ABR8 462 CGATATGTAGATCCGTCCACATGCATTGAACAAGCATTTCATAACATTTTGGGCTGCGAAA
 E66 538 CGATATATAGATCCGTCCACATACATTGAACAAGCATTTCATAACATTTTGGTTTGCAGAAA

Bd21 520 AAATAGAAGTGCGTGGATGCTTGGAGACTTGG-GTAGAAGAGGACAAGAGCTTCTCATGC
 ABR1 522 AAATAGAAGTGCGTGGATGCTTGGAGACTTGG-GTAGAAGAGGACAAGAGCTTCTCATGC
 ABR8 522 AAATAGAAGTGCGTGGATGCTTGGAGACTTGGAGTAGAAGAGGACAAGATCTTCTCATGC
 E66 598 AC-TAGAAGTACGTGGATGCTTGGAGACTTGGAGTAGAAGAGGACAAGAGCTTCTCATGC

Bd21 579 ATGCATGCATGGTACGCAATGTGATAAGCTGTAGTTGAGATCCACCTAAAAAATTCAGA
 ABR1 581 ATGCATGCATGGTACGCCATGTGATAAGCTGTAGTTGAGATCCACCTAAAAAATTCAGA
 ABR8 582 ATGCATGCATGGTACGCAATGTGATAAGCTGTAGTTGAGATCCACCTAAATTTTTCAGA
 E66 657 ATGCATG---GG--CGCGGTATGATAAGCTGTAGTTGAGATCCACCTAAAA---TTCAGA

Bd21 639 AAAGCGGCCGAATTGATAAGTCAGGCCACATCTTTGATGATAGCTAGCCGGCCAGTAGAG
 ABR1 641 AAAGCGGCCGAATTGATAAGTCAGGCCACATCTTTGATGATAGCTAGCCGGCCAGTAGAG
 ABR8 642 AAAGCGGCCGAATTGATAAGTCAGGCCACATCTTTGATGATAGCTAGCCGGCCAGTAGAG
 E66 709 AAAGCGGCCGATTGATAAGTCAGGCCACATCTTTGATGATAGCTAGCCGGCCAGCAGAG

Bd21 699 AGTAGAGACAACAGGTGGTGTATATACAGCAAGTCATCAAATTGCTTTTGTGTTTTCAAA
 ABR1 701 AGTAGAGACAACAGGTGGTGTATATACAGCAAGTCATCAAATTGCTTTTGTGTTTTCAAA
 ABR8 702 AGTAGAGACAACAGGTGGTGTATATACAGCAAATCATCAAATTGCTTTTGTGTTTTCAAA
 E66 769 AGTAGAGACAACAGATGGTGTAT--ACAGCAAGTCATCAAATTGCTTTTGTGTTTTGAAA

Bd21 759 TGAAGCAACGAGTTCCTTTAGATATCACTAACGTGAGTAGTACGAAGTAGAAGAATTTTC
 ABR1 761 TGAAGCAACGAGTTCCTTTAGATATCACTAACGTGAGTAGTACGAAGTAGAAGAATTTTC
 ABR8 762 TGAAGCAACGAGTTCCTTTAGATATCACTAACGTGAGTAGTACGAAGTAGAAGAATTTTC
 E66 827 TGAAGCAACGAGTTCCTTTAGATATCAGTAACGTGA-----TAGAAGAAATTTTC

Bd21 819 TAGCGATAAAATATGGAGTACAACGCTTT-GGCGCGTTGCTCAGCTTTGTGCTCCGTTCA
 ABR1 821 TAGCGATAAAATATGGAGTACAACGCTTT-GGCGCGTTGCTCAGCTTTGTGCTCCGTTCA
 ABR8 822 TAGCGATAAAATATGGAGTACAACGCTTTTGGCGCGTTGCTCAGCTTTGTGCTCCGTTCA
 E66 876 TAGCAATAAAATAT-----ACAGCACTTTTGGCGCCTTGCTCAGCTTTGTGCTCCGTTCA

Bd21 878 TCAAAAAGTCAGACGTGGCCACTTCTAACTTTTCGCGTAACAGAAAAAGAGAGTGAGATCAT
 ABR1 880 TCAAAAAGTCAGACGTGGCCACTTCTAACTTTTCGCGTAACAGAAAAAGAGAGTGAGATCAT
 ABR8 882 TCAAAAAGTCAGCGTGGCCACTTCTGACTTTTCGCGTAACAGAAAAAGAGAGTGAGATTAT
 E66 931 TCAAAAAGTCAGACGTGGCCACTTCTAACTTTTCGCGTAACATAAAAGAGAGTCGGCCAT

Bd21 938 TTTACAGAGATATCATGGCTGGG--TCAGCACGTACGGTAGAGTAATTAAGGCGTACATT
 ABR1 940 TTTACAGAGATATCATGGCTGGG--TCAGCACGTACGGTAGAGTAATTAAGGCGTACATT
 ABR8 942 TTTACAGAGATATCATGGCTGGG--TCAGCACGTACGGTAGAGTAATTAAGGCGTACATT
 E66 991 TT---ACAGATATCATGGCTGGGGTTCAGCACGTATGGTAGAGTAATTAAGGCGTACATT

Bd21 996 TGTAGGGCGGCAAAGAACAAGTTGCGTTTTTACTTCATCCGACAGTAATCTCAGAGAAATA
 ABR1 998 TGTAGGGCGGCAAAGAACAAGTTGCGTTTTTACTTCATCCGACAGTAATCTCAGAGAAATA
 ABR8 1000 TGTAGGGCGGCAAAGAACAAGATGCGTTTTTACTTCATCCGACAGTAATCTCAGAGAAATA
 E66 1048 TGTAGGGCAACAA-GAACAGTTGCGTTTTTACTTCATCCGACAGTAACCTCAGAGAA---

Bd21 1056 GAATGAATATGTAAGTCAAAAGAAGGCGACTAAACTAATTACCGACACAAGTGATTTGTC
 ABR1 1058 GAATGAATATGTAAGTCAAAAGAAGGCGACTAAACTAATTACCGACACAAGTGATTTGTC
 ABR8 1060 GAATGAATATGTAAGTCAAAAGAAGGCGACTAAACTAATTACCGACACAAGTGATTTGTC
 E66 1104 ---TGAATATGCAAGTCAAAAGCAGGCGACTAAACTAATTACCGACACAAGTGATTTGTC

Bd21 1116 GAGCGCGTGGTACGGAAGTACGGAACCTTTATGAACAACACAACAAGGCATGCTGATCAA
 ABR1 1118 GAGCGCGTGGTACGGAAGTACGGAACCTTTATGAACAACACAACAAGGCACGCTGATCAA
 ABR8 1120 GAGCGCGTGGTACGGAAGTACGGAACCTTTATGAACAACACAACAAGGCAAGCTGATCAA
 E66 1161 GATCTCGTGGTACGGAAGTACGGAACCTTTATGAACAACACAACGAGGCAACC---TCAA

Bd21 1176 TCTAGCGTCTCTCTAGAACAAACACGCCC-AGTGCACACGTTGGTACAAGAACACAAAAA
 ABR1 1178 TCTAGCGTCTCTCTAGAACAAACACGCCC-AGTGCACACGTTGGTACAAGAACACAAAAA
 ABR8 1180 TCTAGCGTCTCTCTAGAACAAACACGCCC-AGTGCACACGTTGGTACAACAACACAAAAA
 E66 1218 TCTAGCGTATC--TAGAACAAACACGCCCCAGTGGACACGTTGCTACAACAA----AAAA

Bd21 1235 TGTGTGTACGCACTTATATATCCAACATGTAAGTTCGTCCGAAAAAATCATTTAAAAACTG
 ABR1 1237 TGTGTGTACGCACTTATATATCCAACATGTAAGTTCGTCCGAAAAAATCATAAAAACTG
 ABR8 1239 TGTGTGTACGCACTTATATATCCAACATGTAAGTTCGTCCGAAAAAATCATTTAAAAACTG
 E66 1272 AATGTATACGCACTTACATGTCCAATATGTAAGTTCGTCCGAAAAAATCATTTAAAAACTG

Bd21 1295 AATCCAGCAGCACGTGTTAGGTAGAGAGAGTTCTCCTTGTATTCCAAATAGCATGACGCA
 ABR1 1297 AATCCAGCAGCACGTGTTAGGTAGAGAGAGTTCTCCTTGTATTCCAAATAGCATGACGCA
 ABR8 1299 AATCCAGCAGCACGTGTTAGGTAGAGAGAGTTCTCCTTGTATTCCAAATAGCATGACGCA
 E66 1332 AATCCAGCAGCACGTGTTAGAGAGAGAGATCTCCTTGTATTCAA-AGCATGACGCA

Bd21 1355 GAGGCTAAAAACGTAGGCAACCGAATACACATCGACCTCCCATATCAGAATGATCAAGAT
 ABR1 1357 GAGGCTAAAAACGTAGGCAACCGAATACACATCGACCTCCCATATCAGAATGATCAAGAT
 ABR8 1359 GAGGCTAAAAACGTAGGCAACCGAATACACATCGACCTCCCATATCAGAATGATCAAGAT
 E66 1390 GAG-CTAAAAACGTAGGCAAGCGAATACACATCGACCTCCTCATATCAGAATGATCA-GAT

Bd21 1415 CACACAC-----TCTTGATTTGAGTTTCCTGTG
 ABR1 1417 CACACAC-----TCTTGATTTGAGTTTCCTGTG
 ABR8 1419 CACACAC-----TCTTGATTTGAGTTTCCTGTG
 E66 1448 CACACACGTACTTGCCGTCCGACGCTACTATACATGTCCCTTTAATTCGATTTTCCAGTG

Bd21 1443 GAGCAGAGCAAAAACG-----TACGTACGTACGAGAACACGAGACGAAACAAAACACGA
 ABR1 1445 GAGCAGAGCAAAAACG-----TACGTACGTACGAGAACACGAGACGAAACAAAACACGA
 ABR8 1447 GAGCAGAGCAAAAACG-----TACGTACGTACGAGAACACGAGACGAAACAAAACACGA
 E66 1508 GAGCAGAAAAAAAGCGACCGAGTACGTACGTTGAGAG-CACGAGACGAAACAAAACACAA

Bd21 1497 CAAGAGAGCAAGCAATATCTGGTGTC-AT--ATTCTCCGAGAAAGTGGACGGC-----
 ABR1 1499 CAAGAGAGCAAGCAATATCTGGTGTC-AT--ATTCTCCGAGAAAGTGGACGGC-----
 ABR8 1501 CAAGAGAGCAAGCAATATCTGGTGTC-AT--ATTCTCCGAGAAAGTGGACGGC-----
 E66 1567 CAAGAG--CGAGCAATATC-GATCTCGATCGGCTCTCCGAGAAAGTGGACGGCGCCATGC

Bd21 1547 ---CTTGATGCTTT-TGTTCCACTACCGATCGACCCCTTGCTGTGTCGCATCACCAGTGTC-
 ABR1 1549 ---CTTGATGCTTT-TGTTCCACTACCGATCGACCCCTTGCTGTGTCGCATCACCAGTGTC-
 ABR8 1551 ---CTTGATGCTTT-TGTTCCACTACCGATCGACCCCTTGCTGTGTCGCATCACCAGTGTC-
 E66 1624 ATGCTTGATGCTTTCTGTTCCACTAGCGATCGACCCT-GTCTGTGTCGCATCACCAGTGTC

Bd21 1602 -CCGATCCAAAAAAGCGCCGCATGCATGCAGCAGCTGGCGGTTCCTCCGGCCGCTTATA
 ABR1 1604 -CCGATCCAAAAAAGCGCCGCATGCATGCAGCAGCTGGCGGTTCCTCCGGCCACTTATA
 ABR8 1606 -CCGATCCAAAAAAGCGCCGCATGCATGCAGCAGCTGGCGGTTCCTCCGGCCGCTTATA
 E66 1683 CCGATCCAAAAAAGCGCCGCATGCACAT-GCAGCTGGCGGTTCCTCGAGCTCCGCTTATA

Bd21 1661 TAAGCCCGCCCCCGCGCGTCATAGCC-TGCATTCCCAAATTCGAGTCCCACACACTACT
 ABR1 1663 TAAGCCCGCCCCCGCGCGTCATAGCC-TGCC TTCCCAAATTCGAGTCCCACACACTACT
 ABR8 1665 TAAGCCCGCCCCCGCGCGTCATAGCC-TGCATTCCCAAATTCGAGTCCCACACACTACT
 E66 1742 TAAGCC---CTCCCGCGC--CACAGCCATGTC TTCCCAAATTCGAGTCCCACACAT TACT

Bd21 1720 AGCTAGTACCAG-----TGCCTAGGTGTTTCACGGAACACAG--CACGTACGGC
 ABR1 1722 AGCTAGTACCAG-----TGCCTAGGTGTTTCACGGAACACAG--CACGTACGGC
 ABR8 1724 AGCTAGTACCAG-----TGCCTAGGTGTTTCACGGAACACAG--CACGTACGGC
 E66 1797 AGTGAGTACCTGCAGGCACTGGCTAGCTAGGTGCTTCACAGAACACAAGACGCGTACGGC

Bd21 1767 GGCGTATAGA--TAGA-----TCAAAG-----ATG
 ABR1 1769 GGCGTATAGA--TAGA-----TCAAAG-----ATG
 ABR8 1771 GGCGTATAGA--TAGA-----TCAAAG-----ATG
 E66 1857 GACGCATAGAAC TAGAATCCATCGAATTAATTCGCCATG

ANEXO 5: Alineamiento de las secuencias de nucleótidos de las regiones “*downstream*” del gen *BdALMT1* de las líneas sensibles *Bd* diploides Bd21, ABR1, 160 FIE INIA, ABR2, GAZ8 y la línea tolerante ABR8, y de las líneas alotetraploides *Bh* tolerantes El Molar, Cabeza de Buey (CB) y Castuera. La zona destacada en verde pertenece al final del exón 5 (se puede observar el codón de terminación “TGA”), el resto destacado en negro es la región “*downstream*”.

	10	20	30	40	50	60	70
Bd21	ATCTAGCGCGACTTGCCCACTTCAAAACCCCTGAAAAATCCAAAAAGATGTTGTTATCAACATTGCGAG						
ABR1	ATCTAGCGCGACTTGCCCACTTCAAAACCCCTGAAAAATCCAAAAAGATGTTGTTATCAACATTGCGAG						
160 FIE INIA	ATCTAGCGCGACTTGCCCACTTCAAAACCCCTGAAAAATCCAAAAAGATGTTGTTATCAACATTGCGAG						
ABR2	ATCTAGCGCGACTTGCCCACTTCAAAACCCCTGAAAAATCCAAAAAGATGTTGTTATCAACATTGCGAG						
GAZ8	ATCTAGCGCGACTTGCCCACTTCAAAACCCCTGAAAAATCCAAAAAGATGTTGTTATCAACATTGCGAG						
ABR8	ATCTAGCGCGACTTGCCCACTTCAAAACCCCTGAAAAATCCAAAAAGATGTTGTTATCAACATTGCGAG						
Molar	ATCTAGCGCGACTTGCCCACTTCAAAACCCCTGAAAAATCCAAAAAGATGTTGTTATCAACATTGCGAG						
Cabeza de Buey	ATCTAGCGCGACTTGCCCACTTCAAAACCCCTGAAAAATCCAAAAAGATGTTGTTATCAACATTGCGAG						
Castuera	ATCTAGCGCGACTTGCCCACTTCAAAACCCCTGAAAAATCCAAAAAGATGTTGTTATCAACATTGCGAG						
	80	90	100	110	120	130	140
Bd21	TTGACAAAAGACGCAAACTTCTGCCAAGCATGGTTAGTCTACAGGGGATAACCGTCGGGAGCATCAAGTG						
ABR1	TTGACAAAAGACGCAAACTTCTGCCAAGCATGGTTAGTCTACAGGGGATAACCGTCGGGAGCATCAAGTG						
160 FIE INIA	TTGACAAAAGACGCAAACTTCTGCCAAGCATGGTTAGTCTACAGGGGATAACCGTCGGGAGCATCAAGTG						
ABR2	TTGACAAAAGACGCAAACTTCTGCCAAGCATGGTTAGTCTACAGGGGATAACCGTCGGGAGCATCAAGTG						
GAZ8	TTGACAAAAGACGCAAACTTCTGCCAAGCATGGTTAGTCTACAGGGGATAACCGTCGGGAGCATCAAGTG						
ABR8	TTGACAAAAGACGCAAACTTCTGCCAAGCATGGTTAGTCTACAGGGGATAACCGTCGGGAGCATCAAGTG						
Molar	TTGACAAAAGACGCAAACTTCTGCCAAGCATGGTTAGTCTACAGGGGATAACCGTCGGGAGCATCAAGTG						
Cabeza de Buey	TTGACAAAAGACGCAAACTTCTGCCAAGCATGGTTAGTCTACAGGGGATAACCGTCGGGAGCATCAAGTG						
Castuera	TTGACAAAAGACGCAAACTTCTGCCAAGCATGGTTAGTCTACAGGGGATAACCGTCGGGAGCATCAAGTG						
	150	160	170	180	190	200	210
Bd21	GCAAAAATTAGTATGGTGTACAATACTACGTTATGTATACAGCAAGTGATTAATTCTTCAACGCTATTGA						
ABR1	GCAAAAATTAGTATGGTGTACAATACTACGTTATGTATACAGCAAGTGATTAATTCTTCAACGCTATTGA						
160 FIE INIA	GCAAAAATTAGTATGGTGTACAATACTACGTTATGTATACAGCAAGTGATTAATTCTTCAACGCTATTGA						
ABR2	GCAAAAATTAGTATGGTGTACAATACTACGTTATGTATACAGCAAGTGATTAATTCTTCAACGCTATTGA						
GAZ8	GCAAAAATTAGTATGGTGTACAATACTACGTTATGTATACAGCAAGTGATTAATTCTTCAACGCTATTGA						
ABR8	GCAAAAATTAGTATGGTGTACAATACTACGTTATGTATACAGCAAGTGATTAATTCTTCAACGCTATTGA						
Molar	GCAAAAATTAGTATGGTGTACAATACTACGTTATGTATACAGCAAGTGATTAATTCTTCAACGCTATTGA						
Cabeza de Buey	GCAAAAATTAGTATGGTGTACAATACTACGTTATGTATACAGCAAGTGATTAATTCTTCAACGCTATTGA						
Castuera	GCAAAAATTAGTATGGTGTACAATACTACGTTATGTATACAGCAAGTGATTAATTCTTCAACGCTATTGA						
	220	230	240	250	260	270	280
Bd21	AGTGATTATGATGCTGAGTTTGTATAACAATATTATCGTCTTCAAACAGACGTGAATTATCAACATATAT						
ABR1	AGTGATTATGATGCTGAGTTTGTATAACAATATTATCGTCTTCAAACAGACGTGAATTATCAACATATAT						
160 FIE INIA	AGTGATTATGATGCTGAGTTTGTATAACAATATTATCGTCTTCAAACAGACGTGAATTATCAACATATAT						
ABR2	AGTGATTATGATGCTGAGTTTGTATAACAATATTATCGTCTTCAAACAGACGTGAATTATCAACATATAT						
GAZ8	AGTGATTATGATGCTGAGTTTGTATAACAATATTATCGTCTTCAAACAGACGTGAATTATCAACATATAT						
ABR8	AGTGATTATGATGCTGAGTTTGTATAACAATATTATCGTCTTCAAACAGACGTGAATTATCAACATATAT						
Molar	AGTGATTATGATGCTGAGTTTGTATAACAATATTATCGTCTTCAAACAGACGTGAATTATCAACATATAT						
Cabeza de Buey	AGTGATTATGATGCTGAGTTTGTATAACAATATTATCGTCTTCAAACAGACGTGAATTATCAACATATAT						
Castuera	AGTGATTATGATGCTGAGTTTGTATAACAATATTATCGTCTTCAAACAGACGTGAATTATCAACATATAT						
	290	300	310	320	330	340	350
Bd21	ATGTAAATGAACAGTTTCCTAAATCTTCTTTGTTCAATTTTAAGCTGGTTGGTTGAGAGGGGCCAAGT						
ABR1	ATGTAAATGAACAGTTTCCTAAATCTTCTTTGTTCAATTTTAAGCTGGTTGGTTGAGAGGGGCCAAGT						
160 FIE INIA	ATGTAAATGAACAGTTTCCTAAATCTTCTTTGTTCAATTTTAAGCTGGTTGGTTGAGAGGGGCCAAGT						
ABR2	ATGTAAATGAACAGTTTCCTAAATCTTCTTTGTTCAATTTTAAGCTGGTTGGTTGAGAGGGGCCAAGT						
GAZ8	ATGTAAATGAACAGTTTCCTAAATCTTCTTTGTTCAATTTTAAGCTGGTTGGTTGAGAGGGGCCAAGT						
ABR8	ATGTAAATGAACAGTTTCCTAAATCTTCTTTGTTCAATTTTAAGCTGGTTGGTTGAGAGGGGCCAAGT						
Molar	ATGTAAATGAACAGTTTCCTAAATCTTCTTTGTTCAATTTTAAGCTGGTTGGTTGAGAGGGGCCAAGT						
Cabeza de Buey	ATGTAAATGAACAGTTTCCTAAATCTTCTTTGTTCAATTTTAAGCTGGTTGGTTGAGAGGGGCCAAGT						
Castuera	ATGTAAATGAACAGTTTCCTAAATCTTCTTTGTTCAATTTTAAGCTGGTTGGTTGAGAGGGGCCAAGT						

	360	370	380	390	400	410	420
Bd21	ACCGTGGTGCCACAATATACTTTTGCAAGATCTTATTAGAAGCTGAGGTAAAATAATGCACCTTTCCTGAA						
ABR1	ACCGTGGTGCCACAATATACTTTTGCAAGATCTTATTAGAAGCTGAGGTAAAATAATGCACCTTTCCTGAA						
160 FIE INIA	ACCGTGGTGCCACAATATACTTTTGCAAGATCTTATTAGAAGCTGAGGTAAAATAATGCACCTTTCCTGAA						
ABR2	ACCGTGGTGCCACAATATACTTTTGCAAGATCTTATTAGAAGCTGAGGTAAAATAATGCACCTTTCCTGAA						
GAZ8	ACCGTGGTGCCACAATATACTTTTGCAAGATCTTATTAGAAGCTGAGGTAAAATAATGCACCTTTCCTGAA						
ABR8	ACCGTGGTGCCACAATATACTTTTGCAAGATCTTATTAGAAGCTGAGGTAAAATAATGCACCTTTCCTGAA						
Molar	ACCGTGGTGCCACAATATACTTTTGCAAGATCTTATTAGAAGCTGAGGTAAAATAATGCACCTTTCCTGAA						
Cabeza de Buey	ACCGTGGTGCCACAATATACTTTTGCAAGATCTTATTAGAAGCTGAGGTAAAATAATGCACCTTTCCTGAA						
Castuera	ACCGTGGTGCCACAATATACTTTTGCAAGATCTTATTAGAAGCTGAGGTAAAATAATGCACCTTTCCTGAA						

	430	440	450	460	470	480	490
Bd21	ATGTCGAAGCATAATAATCACCAAGATCATGACAAAATGGATATATGGCAATACCGATCTACTCAGAGAA						
ABR1	ATGTCGAAGCATAATAATCACCAAGATCATGACAAAATGGATATATGGCAATACCAATCTACTCAGAGAA						
160 FIE INIA	ATGTCGAAGCATAATAATCACCAAGATCATGACAAAATGGATATATGGCAATACCAATCTACTCAGAGAA						
ABR2	ATGTCGAAGCATAATAATCACCAAGATCATGACAAAATGGATATATGGCAATACCAATCTACTCAGAGAA						
GAZ8	ATGTCGAAGCATAATAATCACCAAGATCATGACAAAATGGATATATGGCAATACCAATCTACTCAGAGAA						
ABR8	ATGTCGAAGCATAATAATCACCAAGATCATGACAAAATGGATATATGGCAATACCAATCTACTCAGAGAA						
Molar	AAGTTCGAAGCATAATAATCACCAAGATCATGACAAAATGGATATATGGCAATACCAATCTACTCAGAGAA						
Cabeza de Buey	AAGTTCGAAGCATAATAATCACCAAGATCATGACAAAATGGATATATGGCAATACCAATCTACTCAGAGAA						
Castuera	AAGTTCGAAGCATAATAATCACCAAGATCATGACAAAATGGATATATGGCAATACCAATCTACTCAGAGAA						

	500	510	520	530	540	550	560
Bd21	CTTATTAACACAGCTCACTAGAGTTCTCTAATATTTTGTCCAAATACATTCTTCTAGAAATTATAGAAAC						
ABR1	CTTATTAACACAGCTCACTAGAGTTCTCTAATATTTTGTCCAAATACATTCTTCTAGAAATTATAGAAAC						
160 FIE INIA	CTTATTAACACAGCTCACTAGAGTTCTCTAATATTTTGTCCAAATACATTCTTCTAGAAATTATAGAAAC						
ABR2	CTTATTAACACAGCTCACTAGAGTTCTCTAATATTTTGTCCAAATACATTCTTCTAGAAATTATAGAAAC						
GAZ8	CTTATTAACACAGCTCACTAGAGTTCTCTAATATTTTGTCCAAATACATTCTTCTAGAAATTATAGAAAC						
ABR8	CTTATTAACACAGCTCACTAGAGTTCTCTAATATTTTGTCCAAATACATTCTTCTAGAAATTATAGAAAC						
Molar	CTTATTAACACAGCTCACTAGAGTTCTCTAATATTTATGTGCCAAATACATTCTTCTAGAAATTATAGAAAC						
Cabeza de Buey	CTTATTAACACAGCTCACTAGAGTTCTCTAATATGATGTGCCAAATACATTCTTCTAGAAATTATAGAAAC						
Castuera	CTTATTAACACAGCTCACTAGAGTTCTCTAATATGATGTGCCAAATACATTCTTCTAGAAATTATAGAAAC						

	570	580	590	600	610	620	630
Bd21	TAATGGCTGAATTGGACACTGGATGATCGAGTGGAAGTGACTATAGTTCCATGTGCTTTTCATCATGAAC						
ABR1	TAATGGCTGAATTGGACACTGGATGATCGAGTGGAAGTGACTATAGTTCCATGTGCTTTTCATCATGAAC						
160 FIE INIA	TAATGGCTGAATTGGACACTGGATGATCGAGTGGAAGTGACTATAGTTCCATGTGCTTTTCATCATGAAC						
ABR2	TAATGGCTGAATTGGACACTGGATGATCGAGTGGAAGTGACTATAGTTCCATGTGCTTTTCATCATGAAC						
GAZ8	TAATGGCTGAATTGGACACTGGATGATCGAGTGGAAGTGACTATAGTTCCATGTGCTTTTCATCATGAAC						
ABR8	TAATGGCTGAATTGGACACTGGATGATCGAGTGGAAGTGACTATAGTTCCATGTGCTTTTCATCATGAAC						
Molar	TAATGGCTGAATTGGACACTAGATGATCGAGTGGAAGTGACTATAGTTCCATGTGCTTTTCATCATGAAC						
Cabeza de Buey	TAATGGCTGAATTGGACACTAGATGATCGAGTGGAAGTGACTATAGTTCCATGTGCTTTTCATCATGAAC						
Castuera	TAATGGCTGAATTGGACACTAGATGATCGAGTGGAAGTGACTATAGTTCCATGTGCTTTTCATCATGAAC						

	640	650	660	670	680	690	700
Bd21	CATCAGATATTGCATAACAGTGATATCTGCAGAAAATTAGTGATAGATGAAGACATTCATTCCCTTGAATT						
ABR1	CATCAGATATTGCATAACAGTGATATCTGCAGAAAATTAGTGATAGATGAAGACATTCATTCCCTTGAATT						
160 FIE INIA	CATCAGATATTGCATAACAGTGATATCTGCAGAAAATTAGTGATAGATGAAGACATTCATTCCCTTGAATT						
ABR2	CATCAGATATTGCATAACAGTGATATCTGCAGAAAATTAGTGATAGATGAAGACATTCATTCCCTTGAATT						
GAZ8	CATCAGATATTGCATAACAGTGATATCTGCAGAAAATTAGTGATAGATGAAGACATTCATTCCCTTGAATT						
ABR8	CATCAGATATTGCATAACAGTGATATCTGCAGAAAATTAGTGATAGATGAAGACATTCATTCCCTTGAATT						
Molar	CATCAGATATTGCATAACAGTGATATCTGCAGAAAATTAGTGATAGATGAAGACATTCATTCCCTTGAATT						
Cabeza de Buey	CATCAGATATTGCATAACAGTGATATCTGCAGAAAATTAGTGATAGATGAAGACATTCATTCCCTTGAATT						
Castuera	CATCAGATATTGCATAACAGTGATATCTGCAGAAAATTAGTGATAGATGAAGACATTCATTCCCTTGAATT						

Bd21	ATGCAGGT
ABR1	ATGCAGGT
160 FIE INIA	ATGCAGGT
ABR2	ATGCAGGT
GAZ8	ATGCAGGT
ABR8	ATGCAGGT
Molar	ATGCAGGT
Cabeza de Buey	ATGCAGGT
Castuera	ATGCAGGT

ANEXO 6: Alineamiento de las secuencias de nucleótidos de las regiones “*upstream*” del gen *BdMATE1* de las líneas diploides *Bd* sensible Bd21, ABR1 y la tolerante ABR8. Se indica el

triplete de inicio (ATG) y destacada en gris el exón 1, el resto destacado en negro es parte de la región “*upstream*”.

Figure 1 displays the alignment of the Bd21, ABR1, and ABR8 genes across the 700 bp region. The alignment is shown in a grid format with columns representing positions from 10 to 700. The Bd21 sequence is shown in black, ABR1 in red, and ABR8 in green. The alignment shows that the ABR1 and ABR8 sequences are highly similar to the Bd21 sequence, with only a few differences observed. The ABR1 sequence is identical to the Bd21 sequence in the 700 bp region. The ABR8 sequence is identical to the Bd21 sequence in the 700 bp region, except for a single nucleotide change at position 10 (A to G) and a single nucleotide change at position 11 (G to A).

ANEXO 7: Alineamiento de las secuencias de nucleótidos de las regiones “downstream” del gen *BdMATE1* de las líneas diploides *Bd* sensible Bd21, ABR1 y la tolerante ABR8. Según la base

de datos de Bd21 la zona gris corresponde al exón 12, el resto destacado en negro es parte de la región “downstream”.

	10	20	30	40	50	60	70
Bd21	CTGCCATACGCTGATACATTGGTTTGGTTTCTCTCTGTCTCTAATGTTACCGTGGTCTCTAATTGGACCA						
ABR1	CTGCCATACGCTGATACATTGGTTTGGTTTCTCTCTGTCTCTAATGTTACCGTGGTCTCTAATTGGACCA						
ABR8	CTGCCATACGCTGATACATTGGTTTGGTTTCTCTCTGTCTCTAATGTTACCGTGGTCTCTAATTGGACCA						
	80	90	100	110	120	130	140
Bd21	TTGCTCTATACTACCATTACGCTGATACTGGCCAAGAGTATATTTGCAATGAGAATTGACATAAATCTGC						
ABR1	TTGCTCTATACTACCATTACGCTGATACTGGCCAAGAGTATATTTGCAATGAGAATTGACATAAATCTGC						
ABR8	TTGCTCTATACTACCATTACGCTGATACTGGCCAAGAGTATATTTGCAATGAGAATTGACATAAATCTGC						
	150	160	170	180	190	200	210
Bd21	GGATTGTAATCCCATTTTAGCTTTTCGATCGGACGAGTTTTCGTTGCACACAAAATTACTTCCATCTCACA						
ABR1	GGATTGTAATCCCATTTTAGCTTTTCGATCGGACGAGTTTTCGTTGCACACAAAATTACTTCCATCTCACA						
ABR8	GGATTGTAATCCCATTTTAGCTTTTCGATCGGACGAGTTTTCGTTGCACACAAAATTACTTCCATCTCACA						
	220	230	240	250	260	270	280
Bd21	GGAAAATGTTACCATTATCAAAATAAATAATGGATGGAAACATCTCAGAAAACAAAGTTTCCGTAGTATA						
ABR1	GGAAAATGTTACCATTATCAAAATAAATAATGGATGGAAACATCTCAGAAAACAAAGTTTCCGTAGTATA						
ABR8	GGAAAATGTTACCATTATCAAAATAAATAATGGATGGAAACATCTCAGAAAACAAAGTTTCCGTAGTATA						
	290	300	310	320	330	340	350
Bd21	ATGTATTTATGTTGCTGTGTACAGAAACAATGTTTGGAACTTGCATTAGTTTGGTTTATTGCTTCTA						
ABR1	ATGTATTTATGTTGCTGTGTACAGAAACAATGTTTGGAACTTGCATTAGTTTGGTTTATTGCTTCTA						
ABR8	ATGTATTTATGTTGCTGTGTACAGAAACAATGTTTGGAACTTGCATTAGTTTGGTTTATTGCTTCTA						
	360	370	380	390	400	410	420
Bd21	TAAATAGTCCAATCGTATGCAAGGATTAGACTGCTTATCACTGTGTTTCCCATCCGCTAACCACAATTTT						
ABR1	TAAATAGTCCAATCGTATGCAAGGATTAGACTGCTTATCACTGTGTTTCCCATCCGCTAACCACAATTTT						
ABR8	TAAATAGTCCAATCGTATGCAAGGATTAGACTGCTTATCACTGTGTTTCCCATCCGCTAACCACAATTTT						
	430	440	450	460	470	480	490
Bd21	TTATAACTGTATGCTCATGTCTAGCTCACAATTGTGACAAATTCATGCAGGCTCAAGCTCTTCAAAC						
ABR1	TTATAACTGTATGCTCATGTCTAGCTCACAATTGTGACAAATTCATGCAGGCTCAAGCTCTTCAAAC						
ABR8	TTATAACTGTATGCTCATGTCTAGCTCACAATTGTGACAAATTCATGCAGGCTCAAGCTCTTCAAAC						
	500	510	520	530	540	550	560
Bd21	TTTTGCATTTCGGTCGAGACAGCAAGAAATTTGAACTGTGTTTAGCTTGCCTAGGAAAAGATAAAATATGG						
ABR1	TTTTGCATTTCGGTCGAGACAGCAAGAAATTTGAACTGTGTTTAGCTTGCCTAGGAAAAGATAAAATATGG						
ABR8	TTTTGCATTTCGGTCGAGACAGCAAGAAATTTGAACTGTGTTTAGCTTGCCTAGGAAAAGATAAAATATGG						
	570	580	590	600	610	620	630
Bd21	GATATCGAACTTACCAGTTATTGACGAACAGAGCAGTGAATGTCAATATATTACTAGACAGAGAACAATC						
ABR1	GATATCGAACTTACCAGTTATTGACGAACAGAGCAGTGAATGTCAATATATTACTAGACAGAGAACAATC						
ABR8	GATATCGAACTTACCAGTTATTGACGAACAGAGCAGTGAATGTCAATATATTACTAGACAGAGAACAATC						
	640	650	660	670	680	690	700
Bd21	TAGGATTAAAACAAAAACTACGGACAATCAATGTTCTCAAGGGCTTGATATCACATACATCGTGGCACA						
ABR1	TAGGATTAAAACAAAAACTACGGACAATCAATGTTCTCAAGGGCTTGATATCACATACATCGTGGCACA						
ABR8	TAGGATTAAAACAAAAACTACGGACAATCAATGTTCTCAAGGGCTTGATATCACATACATCGTGGCACA						
	710	720	730	740	750		
Bd21	CAATCAGTATAACAACACTACAGGTATACATCATCAATTTTCTCGACTTATCAATTAC						
ABR1	CAATCAGTATAACAACACTACAGGTATACATCATCAATTTTCTCGACTTATCAATTAC						
ABR8	CAATCAGTATAACAACACTACAGGTATACATCATCAATTTTCTCGACTTATCAATTAC						

ANEXO 8: Alineamiento de las secuencias de nucleótidos de las regiones “upstream” del gen *BdMATE2* de las líneas diploides *Bd* sensible Bd21, ABR1 y la tolerante ABR8. Se indica el

triplete de inicio (ATG) y destacado en gris el exón 1, el resto destacado en negro es parte de la región “upstream”.

	10	20	30	40	50	60	70
Bd21	GGTTTAATATAGTATATTCAAAATTT	CAGATTGCATTTGCTATTTATCTTGTTTTT	ATTGTTCTTCAA				
ABR1	GGTTTAATATAGTATATTCAAAATTT	CAGATTGCATTTGCTATTTATCTTGTTTTT	ATTGTTCTTCAA				
ABR8	GGTTTAATATAGTATATTCAAAATTT	CAGATTGCATTTGCTATTTATCTTGTTTTT	ATTGTTCTTCAA				
	80	90	100	110	120	130	140
Bd21	TTGTTTGCGGGAACAAAGACATTCTGGTCAGCTTGATCGTGGCCGCGCGTGATCAATAACCCCTTTGGAG						
ABR1	TTGTTTGCGGGAACAAAGACATTCTGGTCAGCTTGATCGTGGCCGCGCGTGATCAATAACCCCTTTGGAG						
ABR8	TTGTTTGCGGGAACAAAGACATTCTGGTCAGCTTGATCGTGGCCGCGCGTGATCAATAA	TCCTTTGGAG					
	150	160	170	180	190	200	210
Bd21	TTGTATTGATCGCTAAGACGCAGCTTTTCAGTCCGTAGTCGGATCATCAACGTCACCTTCTACCCAAATC						
ABR1	TTGTATTGATCGCTAAGACGCAGCTTTTCAGTCCGTAGTCGGATCATCAACGTCACCTTCTACCCAAATC						
ABR8	TTGTATTGATCGCTAAGACGCAGCTTTTCAGTCCGTAGTCGGATCATCAACGTCACCTTCTACCCAAATC						
	220	230	240	250	260	270	280
Bd21	AAAGAGTTGCCAATCTCAATCGAAATGTCGGACCAACCCATGCCATACCAGCACTAGTCTGCAAAAATTAA						
ABR1	AAAGAGTTGCCAATCTCAATCGAAATGTCGGACCAACCCATGCCATACCAGCACTAGTCTGCAAAAATTAA						
ABR8	AAAGAATTCTCAATCTCAATCGAAATGTCGGACCAACCCATGCCATACCAGCACTAGTCTGCAAAAATTAA						
	290	300	310	320	330	340	350
Bd21	TACTAAGGCATAAAGTGGGGAAAAACCCCAAAAATACGTCTTTTACAGGCCGAGGTACCAACCGGAG						
ABR1	TACTAAGGCATAAAGTGGGGAAAAACCCCAAAAATACGTCTTTTACAGGCCGAGGTACCAACCGGAG						
ABR8	TACTAAGGCATAAAGTGGGGAAAAACCCCAAAAATACGTCTTTTACAGGCCGAGGTACCAACCGGAG						
	360	370	380	390	400	410	420
Bd21	CCGCGGCTTTCCGTTTCTCTTTTCCATCTCCGACGACGATCACGATTAAAACGAATTTATGCGTTCCGT						
ABR1	CCGCGGCTTTCCGTTTCTCTTTTCCATCTCCGACGACGATCACGATTAAAACGAATTTATGCGTTCCGT						
ABR8	CCGCGGCTTTCCGTTTCTCTTTTCCATCTCCGACGACGATCACGATTAAAACGAATTTATGCGTTCCGT						
	430	440	450	460	470	480	490
Bd21	CGCATCCTCCACCCACGCGCGCACGAAACCAATGATATTCCATTCCATGGCGAGGCCACGGTGCCGCTGT						
ABR1	CGCATCCTCCACCCACGCGCGCACGAAACCAATGATATTCCATTCCATGGCGAGGCCACGGTGCCGCTGT						
ABR8	CGCATCCTCCACCCACGCGCGCACGAAACCAATGATATTCCATTCCATGGCGAGGCCACGGTGCCGCTGT						
	500	510	520	530	540	550	560
Bd21	TGGATGCACTGCGTGCCGCGCTCGCCTCTAGCTTGATCTGACGCGCGACACCCCGCCGACGCCGAG						
ABR1	TGGATGCACTGCGTGCCGCGCTCGCCTCTAGCTTGATCTGACGCGCGACACCCCGCCGACGCCGAG						
ABR8	TGGATGCACTGCGTGCCGCGCTCGCCTCTAGCTTGATCTGACGCGCGACACCCCGCCGACGCCGAG						
	570	580	590	600	610	620	630
Bd21	GCGCCATGACGGGGGGCGCCACCCCTCTCAGCGTCTTGTTCCAGGGCGCGAGTTACGGGTGATCCACCC						
ABR1	GCGCCATGACGGGGGGCGCCACCCCTCTCAGCGTCTTGTTCCAGGGCGCGAGTTACGGGTGATCCACCC						
ABR8	GCGCCATGACGGGGGGCGCCACCCCTCTCAGCGTCTTGTTCCAGGGCGCGAGTTACGGGTGATCCACCC						
	640	650	660	670			
Bd21	GCCACACCTCTCTCTCCAAATCAATTTGATCTCTCTGAA						
ABR1	GCCACACCTCTCTCTCCAAATCAATTTGATCTCTCTGAA						
ABR8	GCCACACCTCTCTCTCCAAATCAATTTGATCTCTCTGAA						

ANEXO 9: Alineamiento de las secuencias de nucleótidos de las regiones “downstream” del gen *BdMATE2* de las líneas sensibles diploides Bd21, ABR1 y la línea tolerante ABR8. La zona

destacada en gris pertenece al exón 13, el resto destacado en negro es parte de la región “downstream”.

	10	20	30	40	50	60	70
Bd21	TCCTTCGCAGCTGAACATGTA	CATTCTCGTACAACACATGAAGGCAGGATATTTACACCTCTAAACAGCC					
ABR1	TCCTTCGCAGCTGAACATGTA	CATTCTCGTACAACACATGAAGGCAGGATATTTACACCTCTAAACAGCC					
ABR8	TCCTTCGCAGCTGAACATGTA	CATTCTCGTACAACACATGAAGGCAGGATATTTACACCTCTAAACAGAC					
	80	90	100	110	120	130	140
Bd21	CTAGAATAATCACTGTATCAACTTGTAACCTGAAACATTGCAACCATGATCAACAATAGTATTACTAGT						
ABR1	CTAGAATAATCACTGTATCAACTTGTAACCTGAAACATTGCAACCATGATCAACAATAGTATTACTAGT						
ABR8	CTAGAATAATCACTGTATCAACTTGTAACCTGAAACATTGCAACCATGATCAACAATAGTATTACTAGT						
	150	160	170	180	190	200	210
Bd21	GCATGCAAAATGCAAGACTGACGGCACATCTGCTCTTGATAATCAAGTTAGTGAAACCACGTCTCACAGA						
ABR1	GCATGCAAAATGCAAGACTGACGGCACATCTGCTCTTGATAATCAAGTTAGTGAAACCACGTCTCACAGA						
ABR8	GCATGCAAAATGCAAGACTGACGGCACATCTGCTCTTGATAATCAAGTTAGTGAAACCACGTCTCACAGA						
	220	230	240	250	260	270	280
Bd21	GGAACTCGCAGCCCAGGACTAATGTGCAATGCTATTGTCCAGAAGTAGCTTACATGCAGAGGTAATAACG						
ABR1	GGAACTCGCAGCCCAGGACTAATGTGCAATGCTATTGTCCAGAAGTAGCTTACATGCAGAGGTAATAACG						
ABR8	GGAACTCGCAGCCCAGGACTAATGTGCAATGCTATTGTCCAGAAGTAGCTTACATGCAGAGGTAATAACG						
	290	300	310	320	330	340	350
Bd21	AGTCACTACACAATGTCAACCTTGATGGGCATCTTCAACAACCTTGATATATTAGCCTTGACTAGCAAAGT						
ABR1	AGTCACTACACAATGTCAACCTTGATGGGCATCTTCAACAACCTTGATATATTAGCCTTGACTAGCAAAGT						
ABR8	AGTCACTACACAATGTCAACCTTGATGGGCATCTTCAACAACCTTGATATATTAGCCTTGACTAGCAAAGT						
	360	370	380	390	400	410	420
Bd21	GCCCTGCGTGCTACGGAAACACCTGCATTACGACGGAACCGTAAGTTGTTTGATTTTGTCACTATTATT						
ABR1	GCCCTGCGTGCTACGGAAACACCTGCATTACGACGGAACCGTAAGTTGTTTGATTTTGTCACTATTATT						
ABR8	GCCCTGCGTGCTACGTTAACACCTGCATTACGACGGAACCGTAAGTCGTTGATTTTGTCACTATTATT						
	430	440	450	460	470	480	490
Bd21	TATTCCTTCTTTAATAGTTCGGTTGATGGGGAATTGGGTATTGGAGAAGGGAGGCAGCAACTGTGGGTTGA						
ABR1	TATTCCTTCTTTAATAGTTCGGTTGATGGGGAATTGGGTATTGGAGAAGGGAGGCAGCAACTGTGGGTTGA						
ABR8	TATTCCTTCTTTAATAGTTCGTTGATGGGGAATTGGGTATTGGAGA-----GGTTGA						
	500	510	520	530	540	550	560
Bd21	TTGGGGAGGAGGTTCGGCAAAAAGAAAAAGATATTAGAAAAGATTGGAGTTTGAAACGATAGAAGAACGTG						
ABR1	TTGGGGAGGAGGTTCGGCAAAAAGAAAAAGATATTAGAAAAGATTGGAGTTTGAAACGATAGAAGAACGTG						
ABR8	TTGGGGAGGAGGTTCGGCAAAAAGAAAAAGATATTAGAAAAGATTGGACCTTGAAACGATAGAAGAACGTG						
	570	580	590	600	610	620	630
Bd21	AGGTCACCTGTGATTCGGACGGGCCCATTTTTCAGTTGCCAGTGTTTCAGGGAGGAGATGCATGAGAGGTG						
ABR1	AGGTCGCTGTGATTCGGACGGGCCCATTTTTCAGTTGCCAGTGTTTCAGGGAGGAGATGCATGAGAGGTG						
ABR8	AGGTCACCTGTGATTCGGACGGGCCCATTTTTCAGTTGCCAGTGTTTCAGGGAGGAGATGCATGAGAGGTG						
	640	650	660	670	680	690	700
Bd21	AATTGACGATCACCAAGTGGAACCTTTATAAAGAAAGAAATATATTACCTTGTGAGTTAAGTGTCATTTG						
ABR1	AATTGACGATCACCAAGTGGAACCTTTATAAAGAAAGAAATATATTACCTTGTGAGTTAAGTGTCATTTG						
ABR8	AATTGACGATCACCAAGTGGAACCTTTATAAAGAAAGAAATATATTACCTTGTGAGTTAAGTGTCATTTG						
	710						
Bd21	AATAAATCAACCAACAA						
ABR1	AATAAATCAACCAACAA						
ABR8	AATAAATCAACCAACAA						

ANEXO 10: Microsatélites (SSR)

En la siguiente tabla se indica el tamaño de los fragmentos SSR obtenidos en cada línea tetraploide (*Bh*), las líneas son homocigóticas en todos los loci de SSR analizados.

L1= Bd3GSSR145, L2= Bd1GSSR186, L3= Bd2GSSR212, L4= Bd3GSSR261, L5= Bd2GSSR273, L6= Bd5GSSR311, L7= Bd5GSSR371, L8= Bd4GSSR399, L9= Bd2GSSR430, L10= Bd5GSSR128, L11= Bd1GSSR174, L12= Bd5GSSR187, L13= Bd4GSSR219, L14= Bd4GSSR272, L15= Bd2GSSR291, L16= Bd1GSSR303 y L17= Bd3GSSR357. Los locus con letra B son fragmentos que amplifican en *Bh* pero pertenecen al genomio *Bs*.

	L1	L2	L3	L3B	L4	L5	L6	L7	L8	L8B	L9	L10	L10B	L11	L11B	L12	L13	L14	L14B	L15	L16	L17
Avila1	155	170	185	195	250	260	304	369	374	384	446	104	113	164	164	185	192	253	263	283	298	327
Badajoz2	155	170	185	195	250	260	304	369	374	384	446	104	113	164	164	185	192	253	263	283	298	327
Badajoz3	155	170	185	195	250	260	304	369	374	384	446	104	113	164	164	185	192	253	263	283	298	327
Caceres2	135	170	185	205	250	260	304	369	374	384	446	104	113	164	164	190	192	253	263	288	298	327
Huelva1	155	170	185	205	250	260	304	369	374	384	446	104	113	164	164	185	192	253	263	283	298	327
Huelva2	145	170	185	205	250	260	304	369	374	384	446	104	113	164	164	185	192	253	263	283	298	327
Huelva3	155	170	185	205	250	260	304	369	374	384	446	104	113	164	164	185	192	253	263	283	298	327
Madrid1	145	170	185	195	250	260	304	369	374	384	446	104	113	164	164	180	192	253	263	283	298	327
Cordoba1	155	170	185	195	250	260	304	369	374	384	446	104	113	164	164	185	192	253	263	283	298	327
Salamanca1	145	170	185	195	250	260	304	369	374	384	446	104	113	164	164	190	192	253	263	283	298	327
Almeria3	145	170	185	205	260	265	309	369	374	399	431	104	123	164	165	180	212	253	263	278	303	332
Albacete2	145	170	185	205	250	265	304	369	374	399	431	104	123	164	165	185	217	253	263	278	303	352
Almeria1	145	170	185	205	260	265	309	369	374	399	431	104	123	164	165	185	217	253	263	288	303	332
Almeria2	140	170	185	205	260	265	319	369	374	399	431	104	123	164	165	185	217	253	263	288	303	347
Badajoz4	145	175	185	205	260	260	304	369	374	399	421	104	123	164	165	180	212	253	263	278	303	347
Granada4	145	170	185	205	250	265	309	369	374	399	431	104	123	164	165	185	212	253	263	278	303	332
Granada3	145	170	185	205	250	260	304	369	374	394	431	104	123	164	165	185	212	253	263	278	303	347
Granada5	145	170	185	210	250	265	309	369	374	399	436	104	123	164	165	180	212	253	263	278	303	347
Huesca5	145	175	185	205	260	265	309	369	374	399	431	104	123	164	165	180	217	253	263	278	303	347
Jaen5	145	170	185	205	260	260	319	369	374	399	431	104	123	164	165	180	212	253	263	278	303	332
Jaen6	145	170	185	205	260	265	309	369	374	399	436	104	123	164	165	185	212	253	263	278	303	347
Zaragoza1	145	170	185	205	260	260	319	369	374	399	431	104	123	164	165	185	217	253	263	278	303	347
LasPalmas1	145	170	185	205	260	265	309	369	374	399	431	104	123	164	165	180	212	253	263	288	303	347
Tenerife1	145	175	185	205	250	265	309	369	374	399	431	104	123	164	165	180	217	253	268	278	303	332
Tenerife2	145	175	185	205	250	265	309	369	374	399	431	104	123	164	165	180	217	253	268	278	303	332
CiudadReal1	145	170	185	205	260	260	319	369	374	399	431	104	123	164	165	185	212	253	268	278	303	347
Cadiz3	145	170	185	205	250	260	304	369	374	399	431	104	123	164	165	185	217	253	268	278	303	332
Portugal1	145	170	185	215	260	265	304	369	374	399	431	104	123	164	165	180	212	253	263	278	303	332
Portugal2	145	170	185	205	260	265	309	369	374	399	436	104	123	164	165	180	212	253	263	278	303	347
Gerona1	145	175	185	205	250	265	309	369	374	399	431	104	123	164	165	185	217	253	263	278	303	342
Caceres1	145	170	185	205	260	265	319	369	374	399	431	104	123	164	165	180	217	253	263	278	303	347
Murcia2	145	170	185	205	260	260	304	369	374	399	431	104	123	164	165	185	217	253	263	278	303	347
Iran1	145	185	185	210	260	265	309	369	374	399	431	104	123	164	165	180	217	253	268	278	293	342

En la siguiente tabla se indica el tamaño de los fragmentos SSR obtenidos en cada línea diploide (*Bd*), las líneas son homocigóticas en todos los loci de SSR analizados.

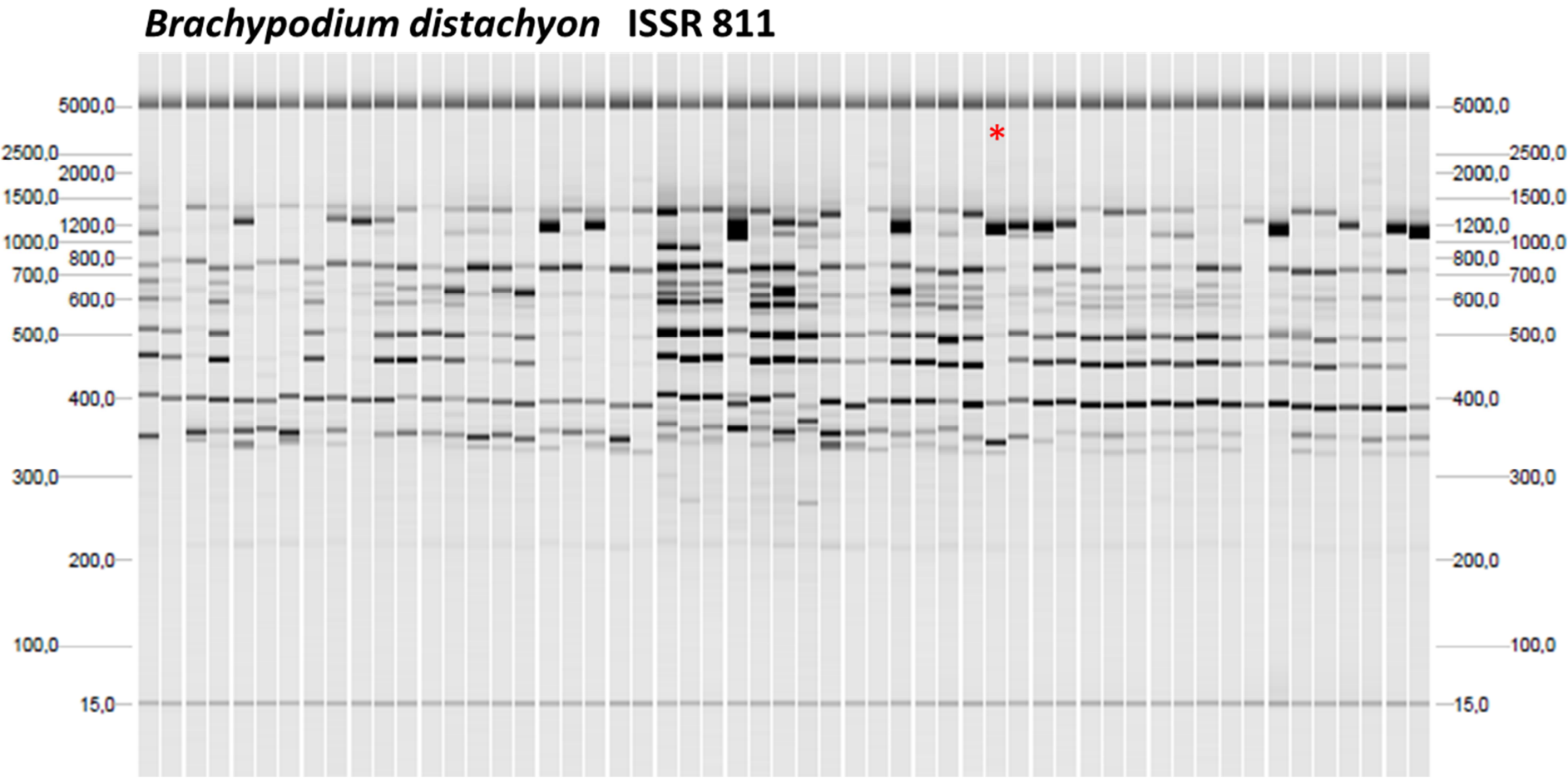
L1= Bd3GSSR145, L2= Bd1GSSR186, L3= Bd2GSSR212, L4= Bd3GSSR261, L5= Bd2GSSR273, L6= Bd5GSSR311, L7= Bd5GSSR371, L8= Bd4GSSR399, L9= Bd2GSSR430, L10= Bd5GSSR128, L11= Bd1GSSR174, L12= Bd5GSSR187, L13= Bd4GSSR219, L14= Bd4GSSR272, L15= Bd2GSSR291, L16= Bd1GSSR303 y L17= Bd3GSSR357

	L1	L2	L3	L4	L5	L6	L7	L8	L9	L10	L11	L12	L13	L14	L15	L16	L17
Albacete1	145	175	215	250	270	304	369	389	426	123	170	185	217	268	288	303	352
Badajoz1	145	185	215	250	270	304	369	389	426	123	160	185	217	268	288	303	352
Cuenca1	145	165	215	250	260	304	369	389	426	123	170	185	217	268	278	303	352
Cuenca2	145	170	215	250	270	304	369	389	426	123	160	185	217	268	288	303	352
Cuenca3	145	175	215	250	260	304	369	389	421	123	160	175	217	263	288	303	357
Granada1	145	170	215	250	270	304	369	394	421	123	170	175	217	268	288	308	342
Guadalajara1	145	180	215	250	265	304	369	389	426	123	170	185	217	268	288	303	352
Guadalajara2	145	175	215	250	270	304	369	389	421	123	170	175	217	263	288	298	347
Guadalajara3	145	175	215	250	265	304	369	389	426	123	160	175	217	268	288	303	352
Guadalajara4	145	175	215	250	265	304	369	389	426	123	170	185	217	268	288	303	352
Huesca1	145	170	215	250	270	304	369	389	426	123	170	185	217	263	288	303	342
Huesca2	145	170	215	250	270	304	369	389	421	123	160	185	217	263	288	303	342
Huesca3	145	175	215	250	270	304	369	389	421	123	160	185	217	263	288	303	342
Jaen1	145	175	215	250	270	304	369	384	426	123	160	185	212	268	288	303	347
Jaen2	145	170	215	250	270	304	369	384	421	123	160	185	217	268	288	303	342
Jaen3	155	170	215	250	270	304	369	394	421	123	160	185	217	268	288	303	342
Segovia1	145	170	215	250	270	304	369	384	426	123	165	185	217	263	288	303	362
Segovia2	150	170	215	250	270	304	369	384	426	123	160	185	217	263	293	303	352
Zaragoza1	145	170	215	250	270	304	369	394	426	123	170	175	217	268	288	303	352
Granada2	145	170	215	250	270	304	369	394	421	123	160	175	212	268	288	298	347
Navarra1	145	170	215	250	260	304	369	389	421	113	160	185	217	263	288	303	347
Cadiz1	145	170	215	250	260	304	369	394	426	123	170	185	212	268	288	303	342
Cadiz2	155	170	215	250	260	304	369	394	421	123	160	185	217	268	293	308	342
Valladolid1	145	170	215	250	270	304	369	384	426	123	170	185	217	268	288	308	357
Valencia1	145	165	210	245	265	309	369	384	431	123	165	175	217	263	278	303	347
Valencia2	145	170	215	250	270	304	369	389	426	123	170	185	217	263	288	303	342
Lerida1	145	170	215	250	270	304	369	389	421	123	170	185	217	263	288	303	342
Jaen4	145	165	210	245	265	309	369	389	431	123	165	175	217	263	278	303	347
Palencia1	145	175	215	250	270	304	369	389	421	123	160	185	217	263	288	303	352
Murcia1	145	175	215	250	270	304	369	389	421	123	160	185	217	268	288	303	347
Turquia1	145	175	215	245	270	304	369	384	426	113	170	185	217	268	288	303	352
Francia1	145	175	215	250	280	304	369	389	421	123	160	185	217	263	288	303	352
Huesca4	145	175	215	250	260	304	369	389	421	113	170	185	217	263	288	303	352
	L1	L2	L3	L4	L5	L6	L7	L8	L9	L10	L11	L12	L13	L14	L15	L16	L17

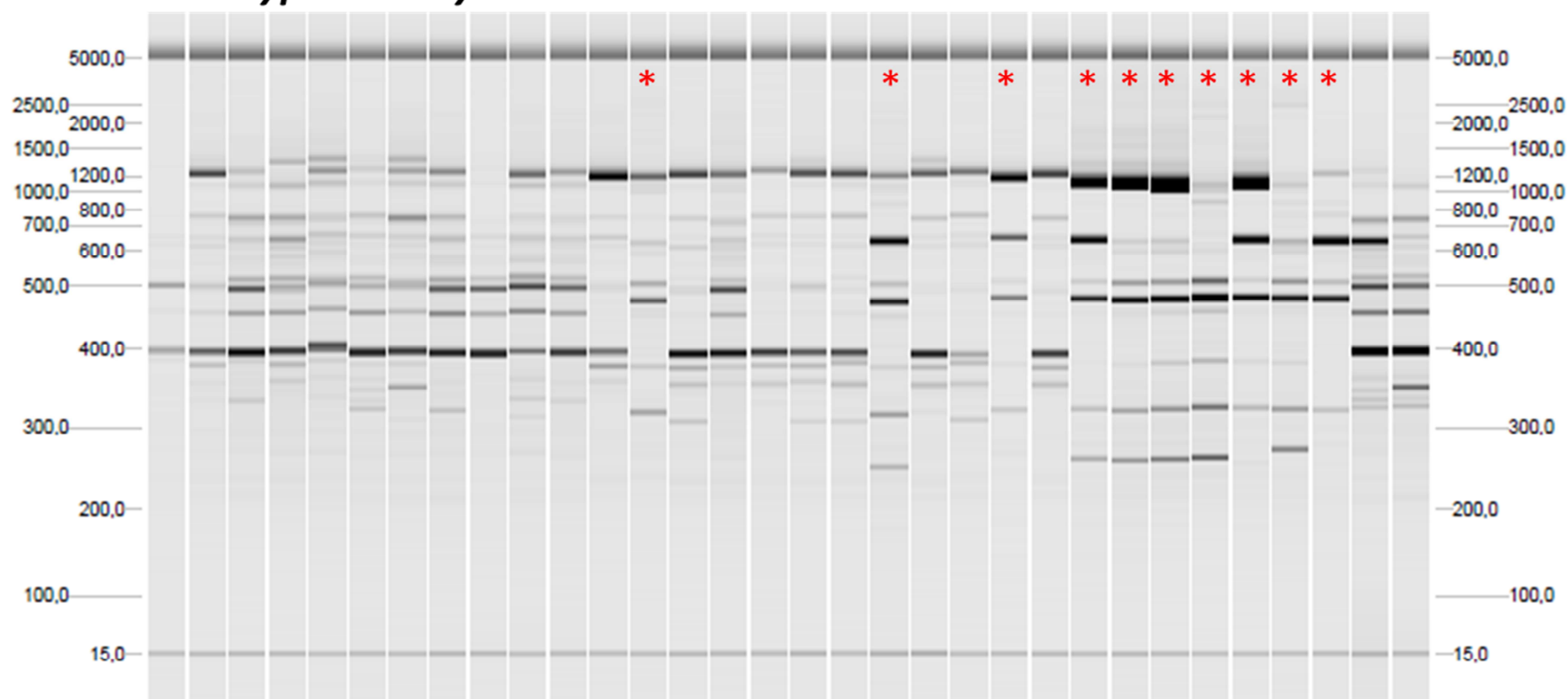
Navarra2	145	175	215	250	270	304	369	389	421	113	170	185	217	263	288	303	342
Valladolid2	150	170	215	250	270	304	369	389	421	123	160	185	217	263	288	303	352
Italia1	140	160	215	260	265	319	369	399	436	123	170	180	212	263	288	303	332
Croacia1	145	175	210	260	265	309	369	399	436	123	165	180	217	263	278	303	342
Turquia2	145	170	210	260	260	309	369	399	426	113	165	180	217	268	278	303	342
Iraq1	145	175	215	245	270	304	369	399	426	123	170	175	217	268	288	303	342
Iraq2	145	185	215	245	270	309	369	399	426	123	170	185	217	268	288	303	342
Turquia3	145	175	215	245	270	304	369	384	426	113	170	185	217	268	288	303	352
Turquia4	145	175	215	260	270	309	369	384	426	123	170	175	217	268	288	303	342
Turquia5	145	175	215	245	270	304	369	384	436	123	170	185	217	268	288	303	342
Turquia6	145	175	215	245	270	309	369	384	426	123	170	185	217	268	288	303	352
Turquia7	145	175	215	245	270	309	369	399	426	123	170	175	217	268	288	303	342
Turquia8	145	175	215	245	270	309	369	384	426	123	170	185	217	268	288	303	342
Turquia9	145	175	215	245	270	309	369	384	426	123	170	185	217	268	288	303	352
Ucrania1	145	170	210	260	265	309	369	399	436	123	165	180	217	263	278	303	342
Iraq3	145	185	215	245	270	309	369	399	426	123	170	185	217	268	288	303	342
Iraq4	145	185	215	260	270	309	369	394	426	123	170	185	217	268	288	303	352
Iraq5	145	185	215	245	270	304	369	399	426	123	170	175	217	268	288	303	342
Turquia10	145	175	215	245	270	309	369	384	426	123	170	185	217	268	288	303	342

SSR, <i>Brachypodium</i> <i>stacei</i> (2n=20)	L1	L2	L3	L4	L5	L6	L7	L8	L9	L10	L11	L12	L13	L14	L15	L16	L17
Almeria, cala chica	s/i	s/i	186	S/i	S/i	S/i	S/i	374	S/i	104	164	175	S/i	254	S/i	S/i	S/i
Almeria, San José	s/i	s/i	186	S/i	S/i	S/i	S/i	374	S/i	104	164	175	S/i	254	S/i	S/i	S/i
Las Palmas, Lanzarote	s/i	s/i	186	S/i	S/i	S/i	S/i	377	S/i	104	164	175	S/i	254	S/i	S/i	S/i
Tenerife, Gomera	s/i	s/i	186	S/i	S/i	S/i	S/i	377	S/i	104	164	175	S/i	254	S/i	S/i	S/i
Almería, Sorbas	s/i	s/i	186	S/i	S/i	S/i	S/i	374	S/i	104	164	170	S/i	254	S/i	S/i	S/i
Almería, cabo de gata	s/i	s/i	186	S/i	S/i	S/i	S/i	374	S/i	104	164	175	S/i	254	S/i	S/i	S/i
Jaen, Tiscar	s/i	s/i	186	S/i	S/i	S/i	S/i	374	S/i	104	164	175	S/i	254	S/i	S/i	S/i
Jaen, Tiscar	s/i	s/i	186	S/i	S/i	S/i	S/i	374	S/i	104	164	175	S/i	254	S/i	S/i	S/i
Argelia	s/i	s/i	186	S/i	S/i	S/i	S/i	374	S/i	104	164	175	S/i	254	S/i	S/i	S/i
S/i = sin información																	

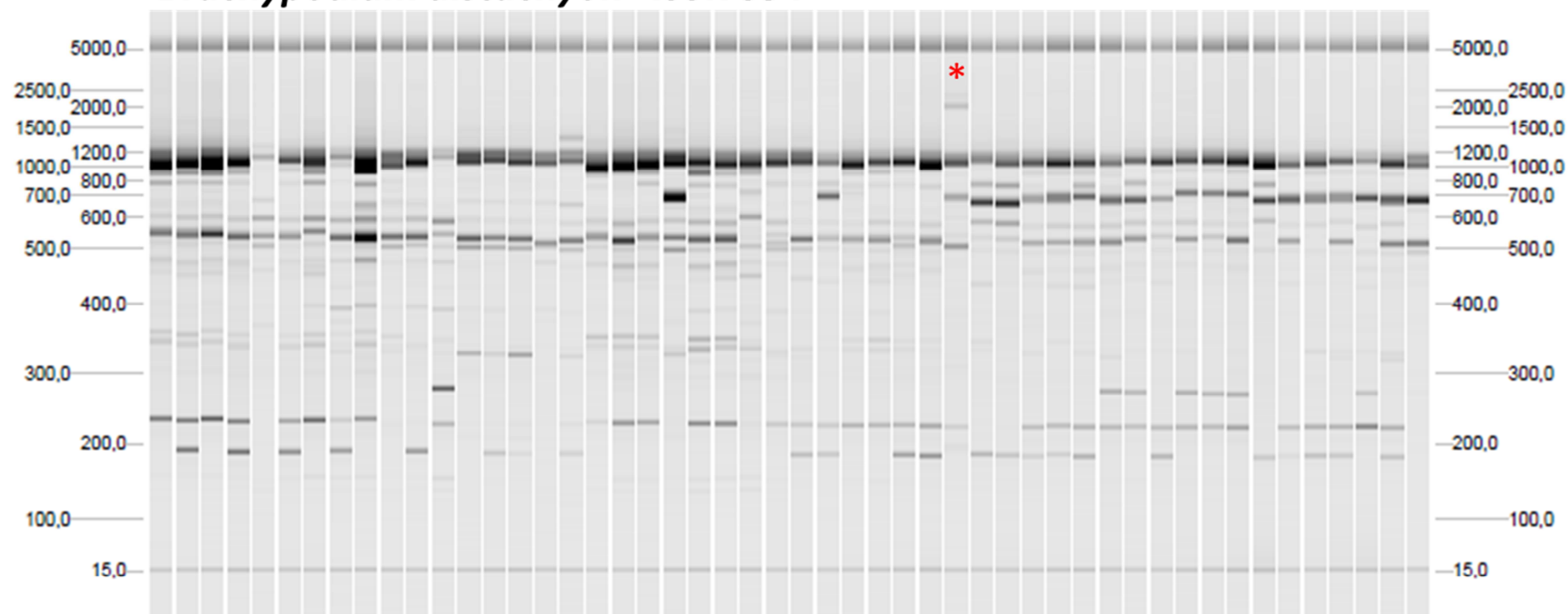
ANEXO 11: Perfiles de amplificación obtenidos con los siete cebadores ISSR en *Brachypodium distachyon* y *Brachypodium hybridum*.



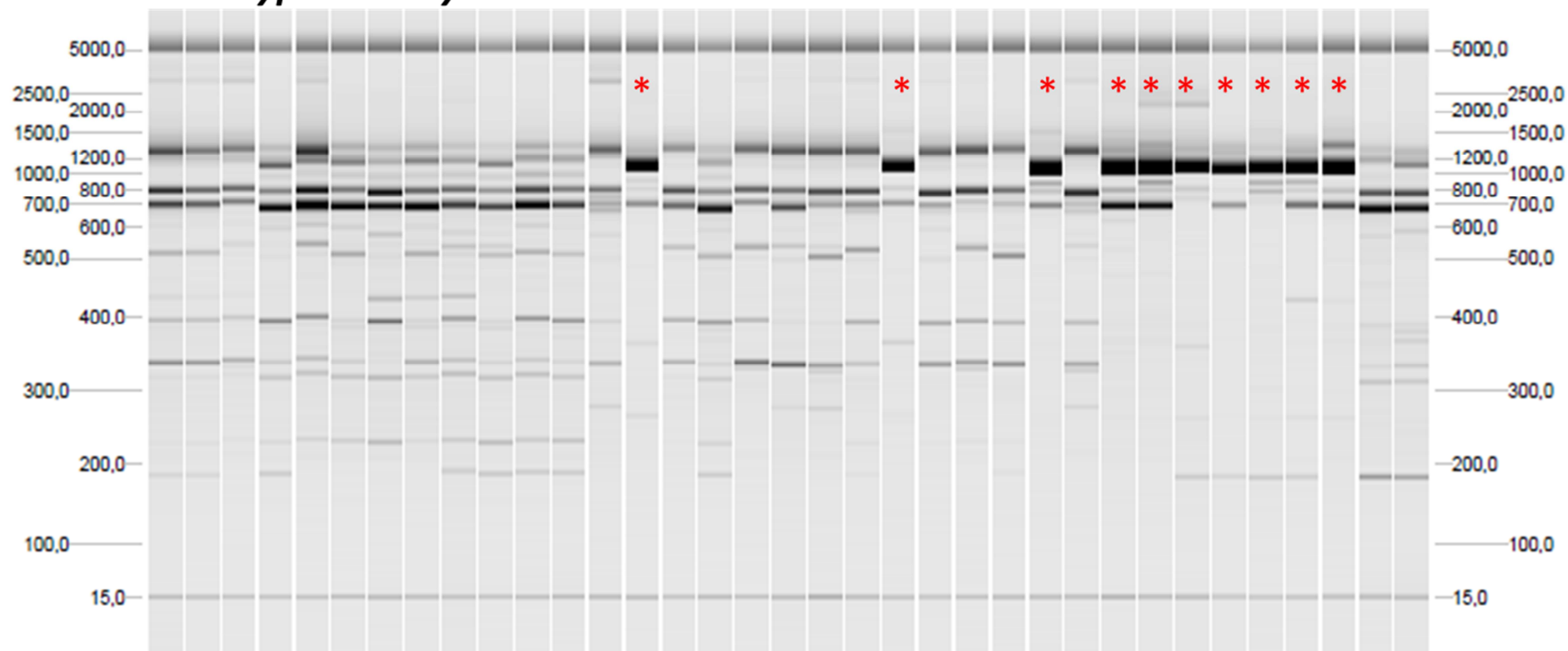
***Brachypodium hybridum* ISSR 811**



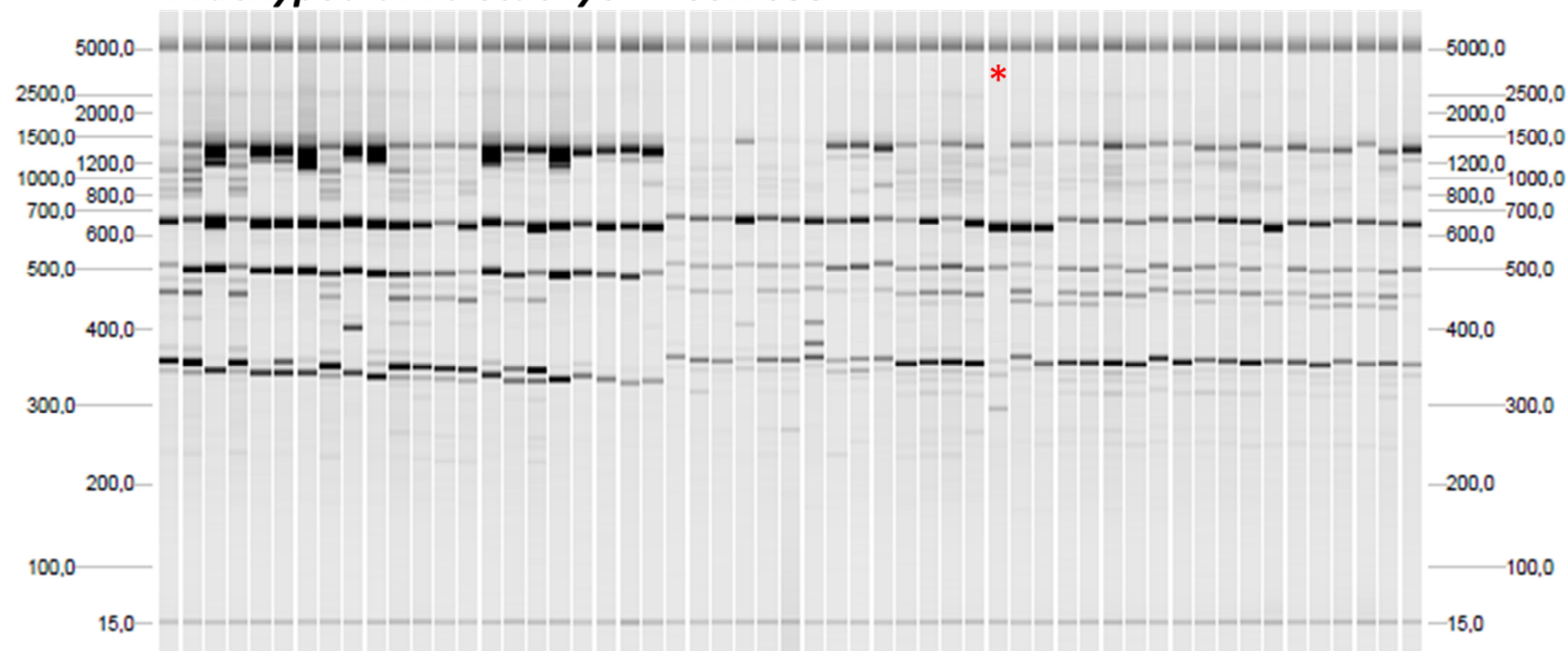
***Brachypodium distachyon* ISSR 834**



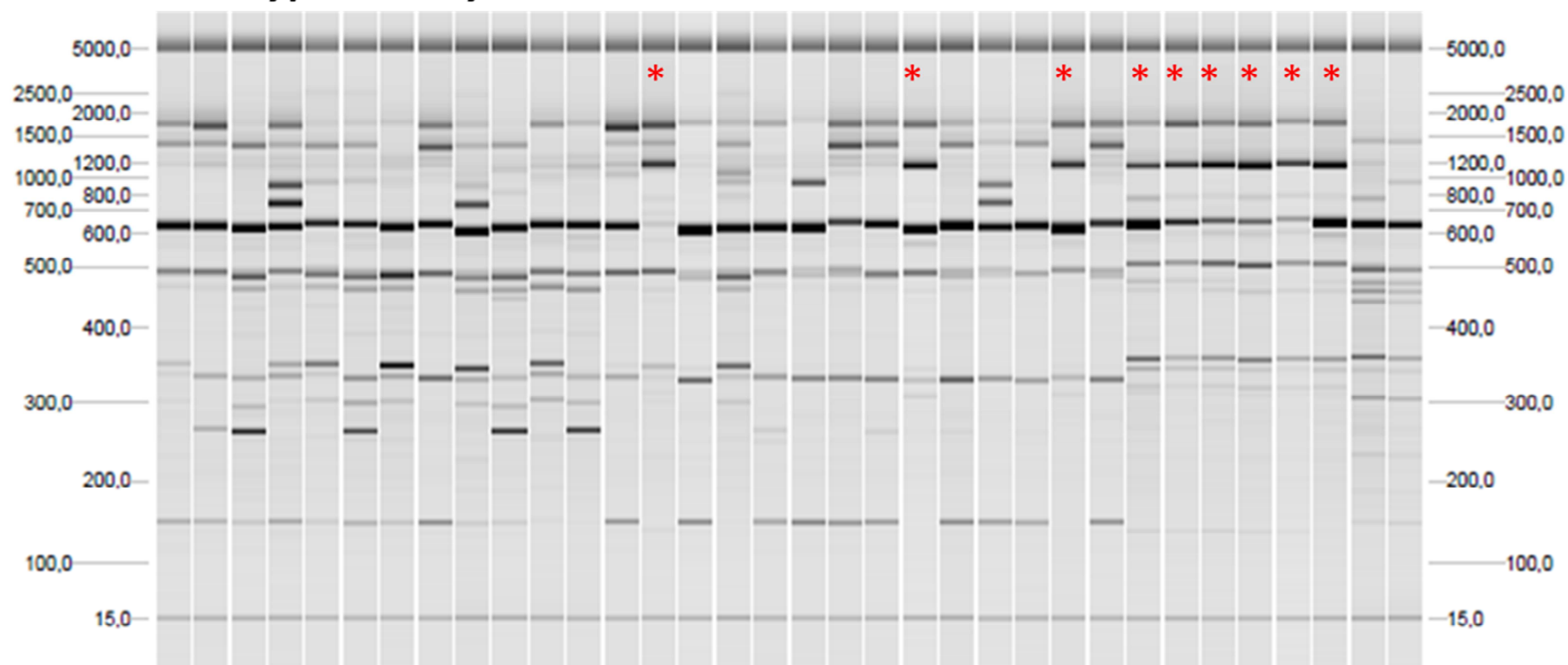
***Brachypodium hybridum* ISSR 834**



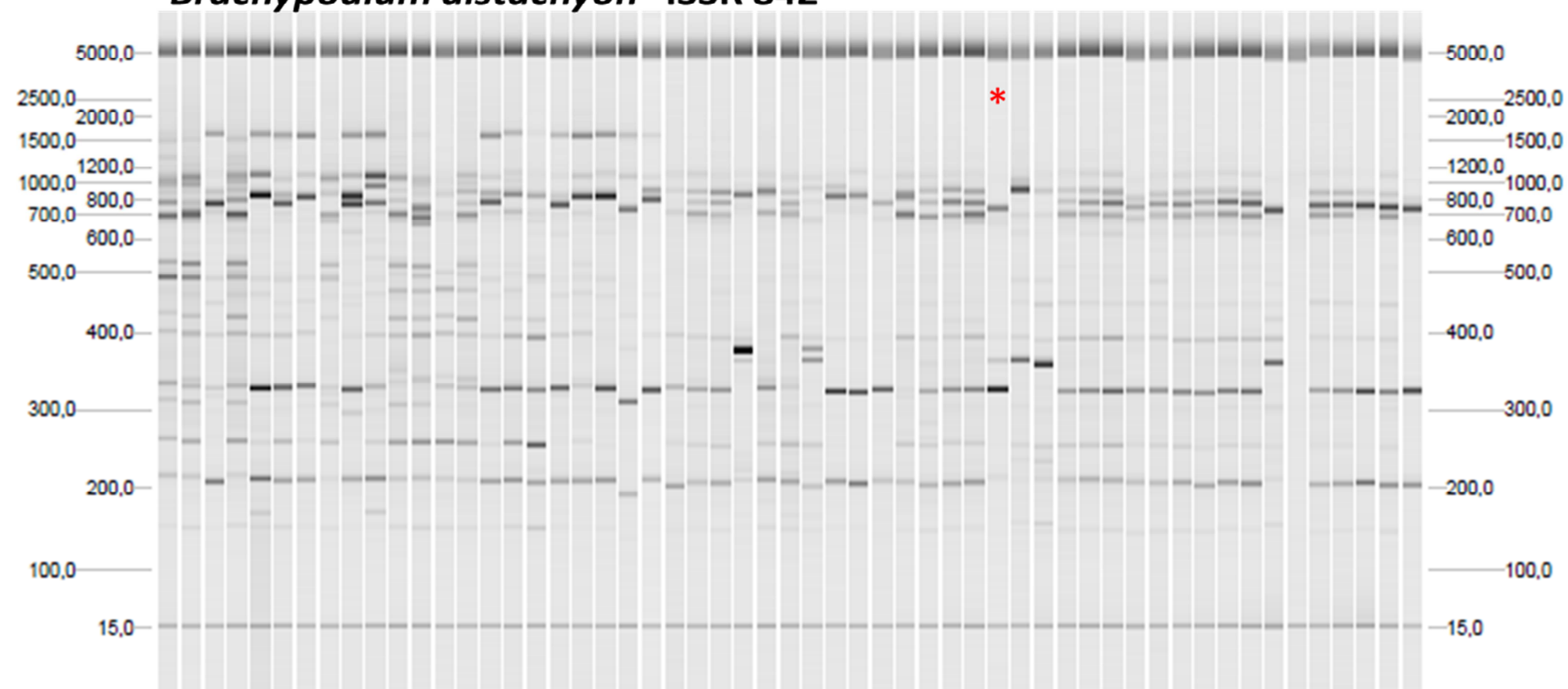
***Brachypodium distachyon* ISSR 835**



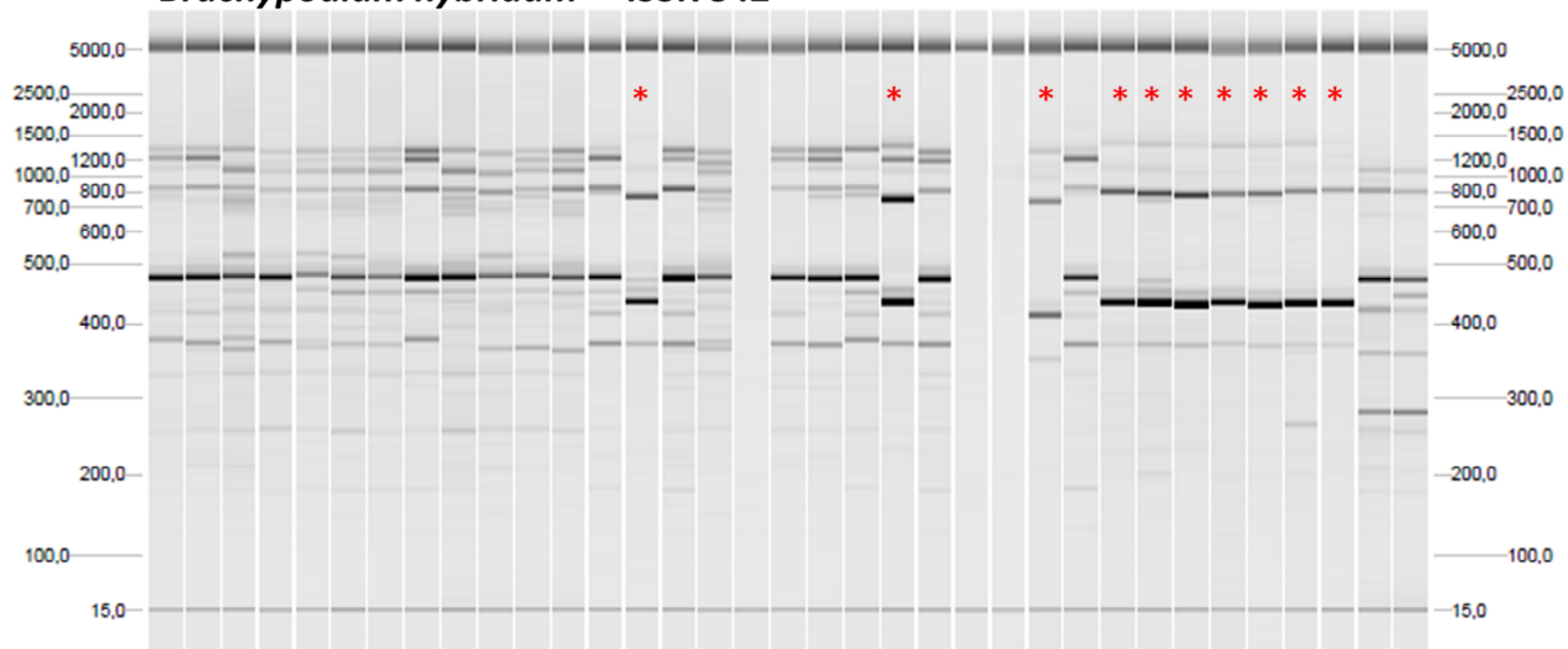
Brachypodium hybridum ISSR 835



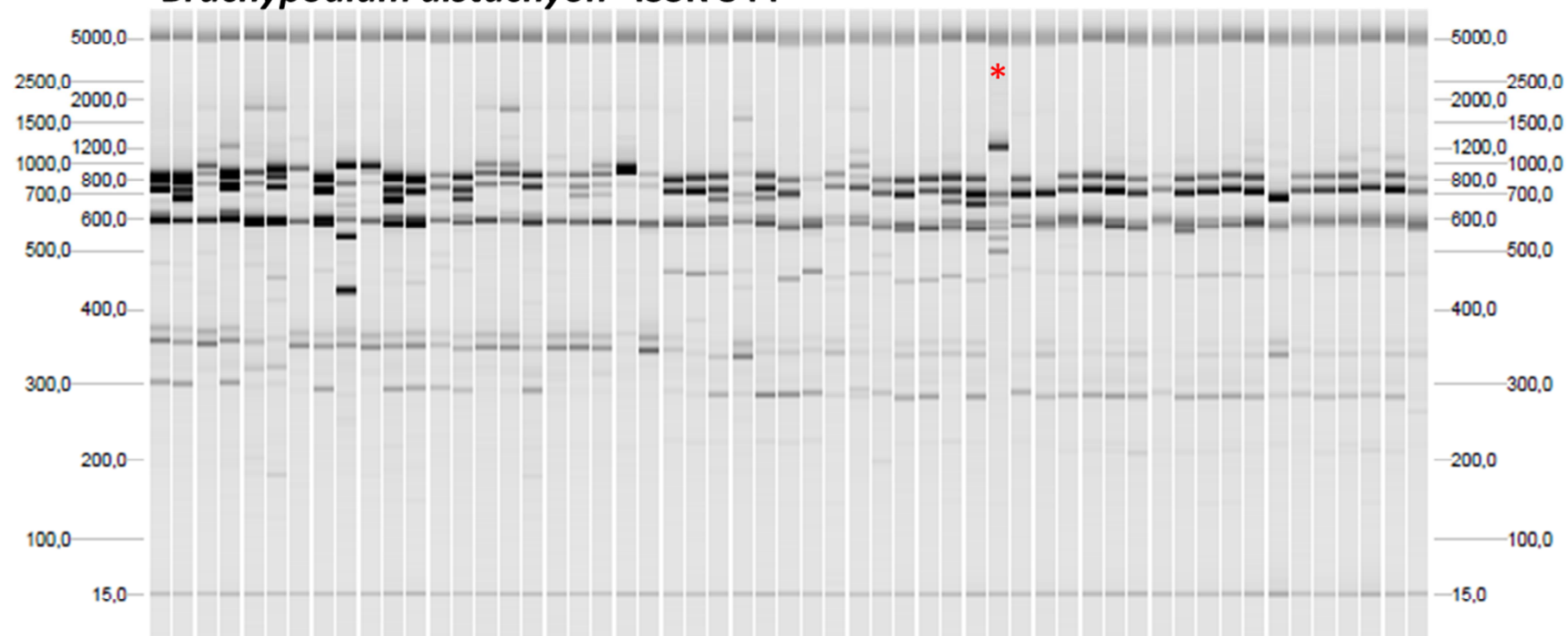
***Brachypodium distachyon* ISSR 842**



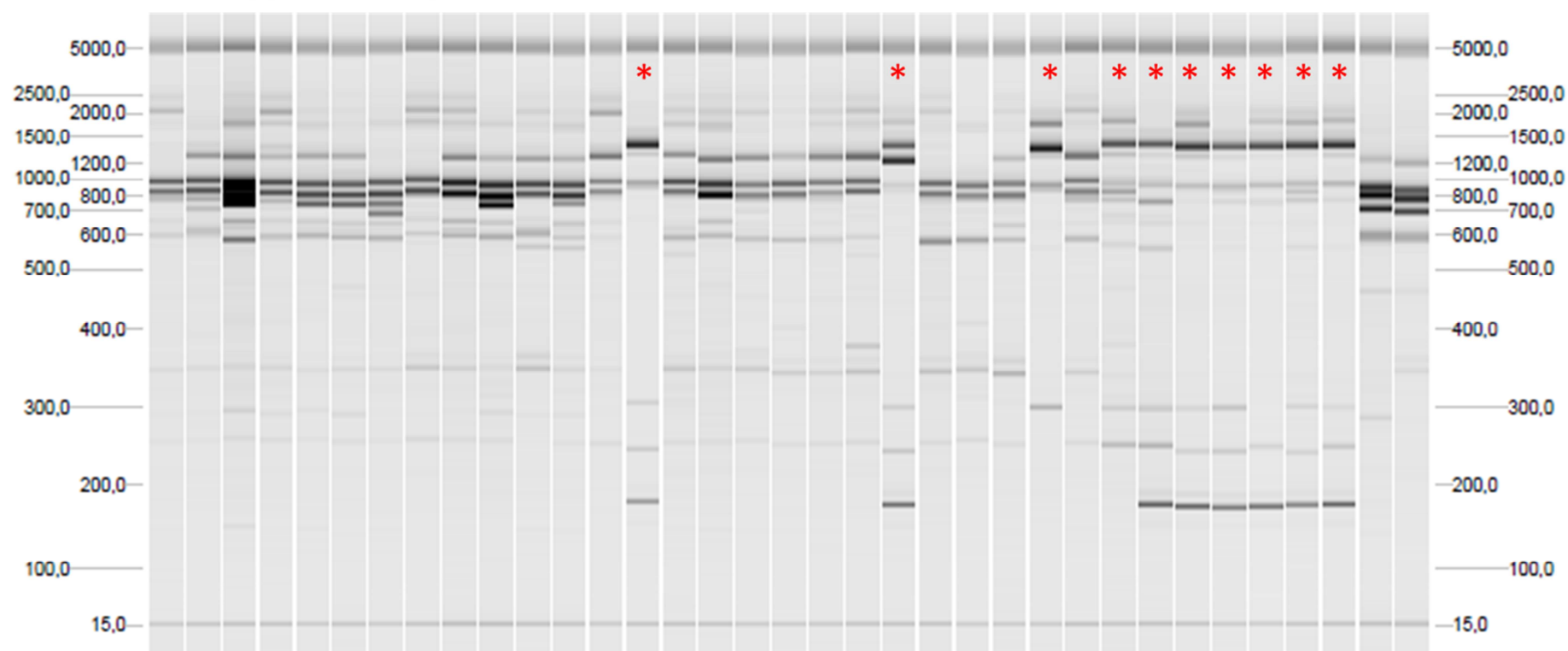
***Brachypodium hybridum* ISSR 842**



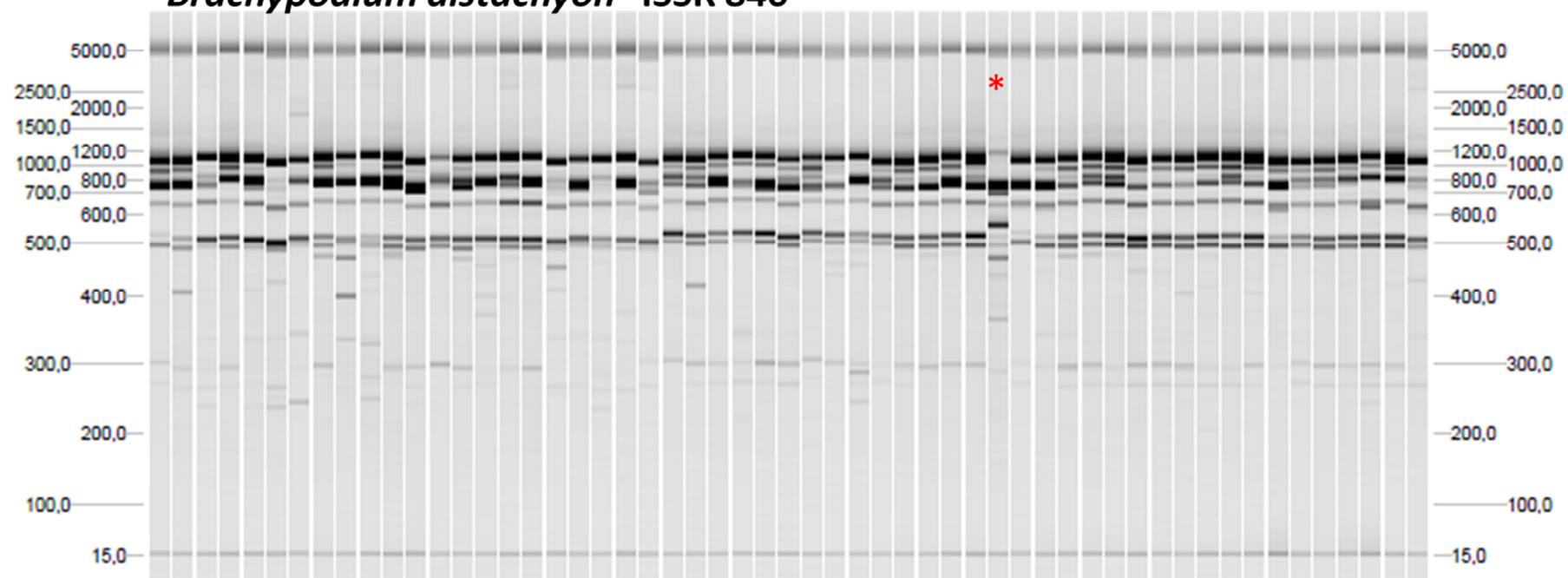
***Brachypodium distachyon* ISSR 844**



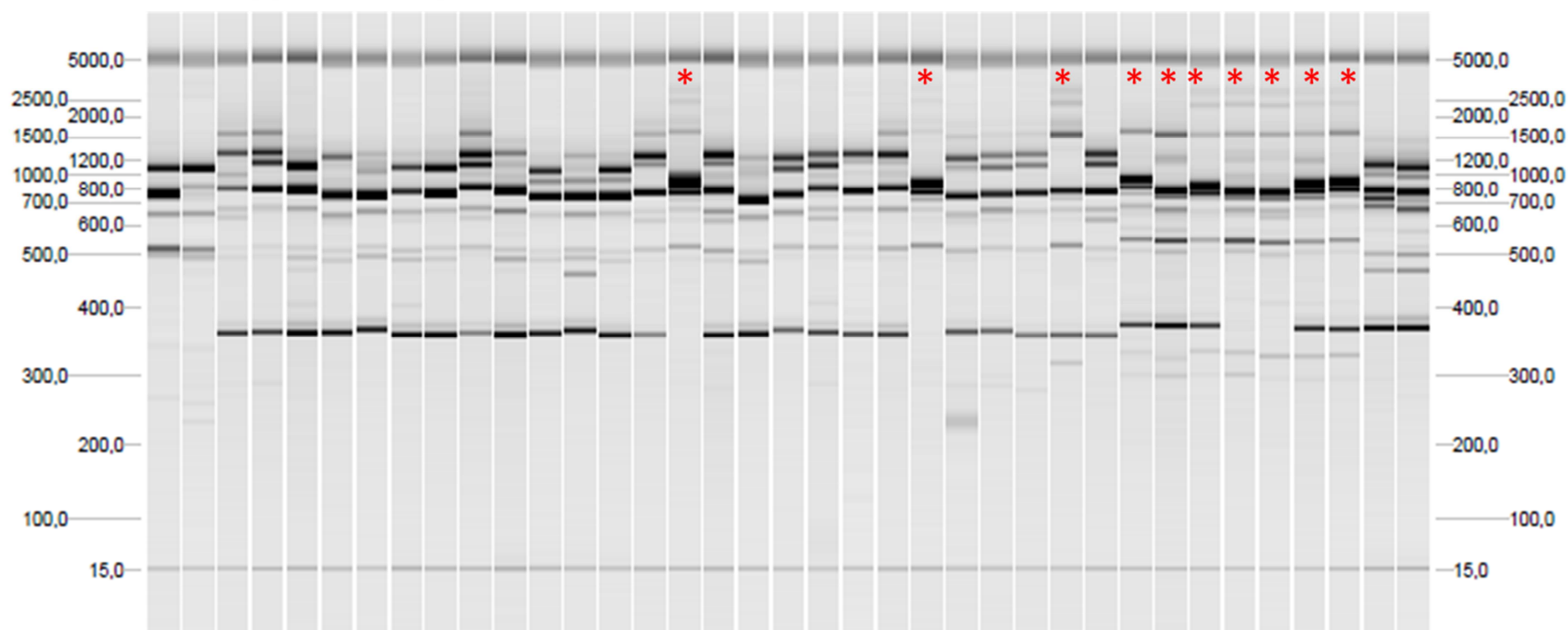
***Brachypodium hybridum* ISSR 844**



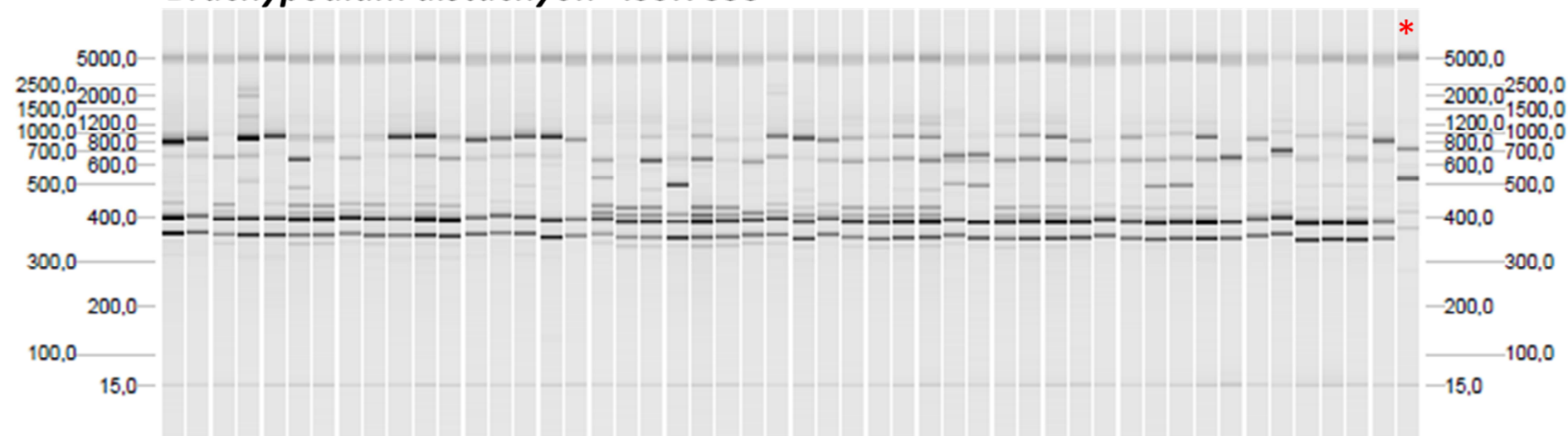
***Brachypodium distachyon* ISSR 846**



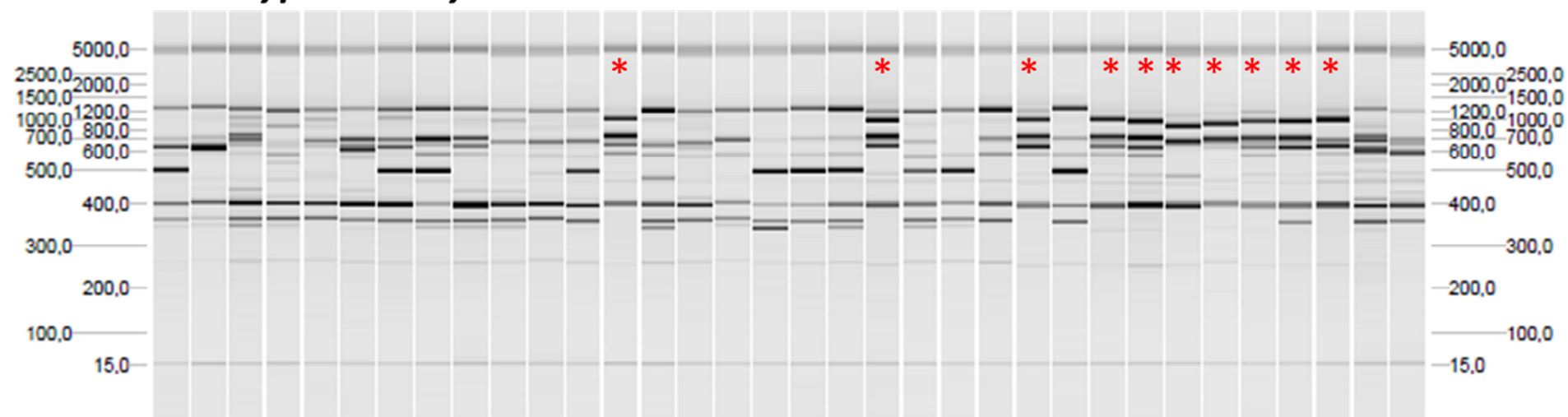
***Brachypodium hybridum* ISSR 846**



***Brachypodium distachyon* ISSR 855**



***Brachypodium hybridum* ISSR 855**



ANEXO 12: Inter-microsatélites (ISSRs)

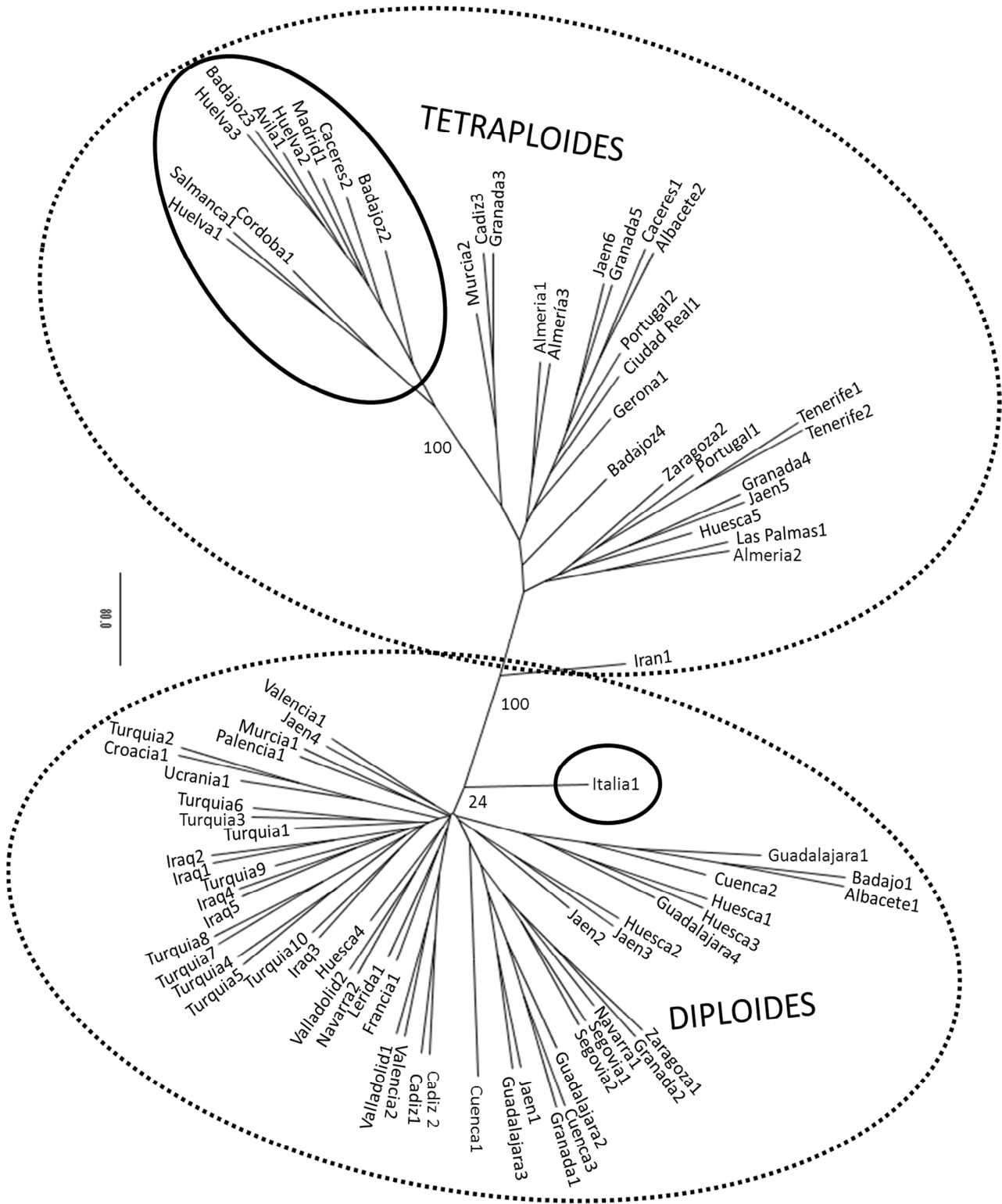
Matriz de presencia (1) y ausencia (0) de 116 fragmentos de ISSR obtenidos con siete cebadores distintos en las 52 líneas diploides *Bd* analizadas. El número 9 significa ausencia de dato o sin información.

[illegible]

Matriz de presencia (1) y ausencia (0) de 139 fragmentos de ISSR obtenidos con siete cebadores distintos en las 33 líneas alotetraploides *Bh* analizadas. El número 9 significa ausencia de dato o sin información.

Almeria3	000000100100000110000010100101110110100010000010010001000101111000011000010010011110000100010011100001001100011010110000010110110011010000010100010001111
Almeria1	01010010111100001100000101010011101100010101000100100001011011110000110001100100100101001001101101010111000010100110011010000010100000001111
Almeria2	0101111011101010001000101000011101100000100000100101001110010110001110101110100100101000010111011010000100010100110011011010100000101111
Badajoz4	10111110111100010100001011100111011000101000111001000110010111100001100011001001111010001011010110100110000101001100110100100101101001111
Granada4	111110101110001001001010100100110100000010001010010101110101110001110101110100100101000010111011010010100010100110011011000010100000001101
Huesca5	010111101101101001001010101011010100100010001010010100111011110001110101100100100001000010111011010010100010100110011010000010111100101101
Jaen5	111110101111001001000010100100110100000000000100101011101011110000110101100100100100000101111011010010100010100110011011000010100010001101
Zaragoza2	0111111011001010010010101010111101100000100001100101011000010110100110100010100111101000100101011010011100010100110011010000010101000101111
LasPalmas1	00000110110000100010101010110111011000001000001001011011100101100011101010101001001010000101110110100001010100110011011000010000000101111
Tenerife1	011011101100101010001010100101110110010000100010010111000111101001101010101001111010000101001110100101010100111011010000010000000001101
Tenerife2	01101110110010101000101010010111011010000010001001010011100111100001101000101001111010000101110110100101010100110011010000010000010001101
Jaen6	0100100001100001000000111100011000000010101100100100001001011010000110101100000110101000101000001010111000010110110011011000010000010001101
Cordoba1	01101011001010010001000010000000000001001010001001000100000000010000111010000000001100010000000011110000011110100000000100100101000001001
Ciudad Real1	0101100001111001000000101010011100001000000000100100001001011010000110101100100111101000101001011010011100010110110011010000000101001001111
Portugal1	0101111011100001010000101001011101101000100110100101011000011101100110101110100111101000010101011010010100001010110011010000010101000001101
Cadiz3	0100101001111001000000101010011100001000000000100100001001999999999999999999911101000010100011010010100010100110011010000010001000001111
Portugal2	0101000001111001000000101010001000000000000101001100010010111100001100011001001000010001001000110100111000101101100110100000000010001111
Gerona1	1101001001111001000000101011001100000100111000100100001001011110100110000100100111101000101000011010011000010100110011010000010001010001101
Caceres1	0101000001111001001000101110011000001000101000100100001001010111000110101100100111101000101000011010111100010100110011010000010001010001111
Salamanca1	0100101100101100000100001000000000000100001000110100001000101100010000110100000101110100010000001111000001111010000001010010010000001001
Albacete2	1101000001110001000000101100011000001000100000100110001001011101000110101100100111000000101000011010110100010100100011010000010001011001111
Granada3	01001010011110010000001010100111000100001000111001000010019999999999999999999900100000010100011010110100010100100011010000000001010001111
Murcia2	01011000011110010000001110110110000000001000001001000001001999999999999999999999001000100101011010111000010100100001010000010001001001101
Huelva1	0100100100001000000101001000000000000100001000100001000010000011001000001111000010000000100100000011101000001110100100101000001001
Granada5	0101000001110001000000101110011100000100111000100110001001011010000110101100100111001000101100011010011000001010110001010000010001010001101
Badajoz2	101010110000110100010010100000000000010000100110101001101010000100000001110000101100010110100000110101100010110100100101001011001
Huelva2	00100011000011000001010010000000000100000010001010000110001000010100011101000000000110000101010111110000011101100010110100100101001011001
Badajoz3	0010001100001101000100000000000000100100001000101001100010000100000011010000000111000010000000111000001110110001011010010000001011001
Madrid1	00100011101011010001000010000000000101000001000111000011000100001000000110100000000011000010100000111100100011101100000110100100100001011001
Caceres2	0010100100001001000101100000000000010100000100010100101100010000100000011010000000111100001010000001110000001111100000110100110101001011001
Huelva3	00101011000011010001010010000000000101000001001111000010000100001000000110100001001111000011100000111101000111101100010100100100101001011101
Avila1	010010110000101000010010100000000001000001000111000010000000001000000110100000001111000010100000111100000111101100010110100100101001011001
Iran1	0011111011011001001000101010001010100001000010100111110100000101000110101010010100000010001101011000010110011100101110010000011001001101100

Anexo 13: Dendograma con ISSRs elaborado mediante el método NJ, utilizando distancias de restricción. Las líneas o ecotipos tolerantes se encuentran encerradas con una elipse continua de color negro.



Anexo 14: Valor de pH del suelo por cada provincia de España.

Nombre	Localidad	pH parcela muestreada	Media pH provincia	Desviación estandar
E2	Albacete, Guadalajara, España	8,5	8,4	0,16
E4	Albacete, España	8,4	8,4	0,16
E5	Albacete, España	8,4	8,4	0,16
E7	Badajoz, Fregenal, España	6.9	6.7	1.13
M23	Cádiz, España	8.2	8.09	0.24
M24	Cádiz, España	7.6	8.09	0.24
E8	Cuenca, Gabaldón., España	8.6	8.66	1.08
E10	Cuenca, Tórdiga, España	8.5	8.66	1.08
E12	Cuenca, Paso Rocho, España	8.5	8.66	1.08
E14	Cuenca, H. Marquesado, España	8.5	8.66	1.08
E16	Cuenca, España	8.3	8.66	1.08
E18	Cuenca, Río cuervo, España	8.3	8.66	1.08
E20	Granada, Onitar, España	8.4	8.37	0.42
E22	Granada, Zegri, España	8.5	8.37	0.42
E24	Granada, Iznalloz, España	8.6	8.37	0.42
E26	Granada, Baza, España	8.6	8.37	0.42
M21	Granada, España	8.2	8.37	0.42
E28	Guadalajara, España	8.3	7.65	0.98
E31	Guadalajara, España	8.3	7.65	0.98
E32	Guadalajara, España	6.2	7.65	0.98
E34	Guadalajara, España	8.2	7.65	0.98
E36	Guadalajara, España	8.2	7.65	0.98
E38	Guadalajara, España	8.5	7.65	0.98
ABR3	Huesca, Aisa, España	8.5	8.36	0.20
ABR4	Huesca, Arén, España	8.4	8.36	0.20
ABR5	Huesca, Jaca, España	8.3	8.36	0.20
E41	Huesca, España	8.4	8.36	0.20
E44	Huesca, España	8.4	8.36	0.20
E47	Huesca, Escanilla, España	7.9	8.36	0.20
E50	Huesca, Nueno, España	8.4	8.36	0.20
E57	Jaén, Sierra Segura, España	7.8	8.02	0.71
E58	Jaén, El tranco, España	8.3	8.02	0.71
M30	Jaén, España	8.5	8.02	0.71
E54	Jaén, Paso Tiscar, España	8.2	8.02	0.71
M29	Lérida, España	8.1	7.87	0.77
M28	Lugo, España	6.8	5.41	0.98
M32	Murcia, España	8.2	8.17	8.35
ABR6	Navarra, Arcos, España	6.8	8.01	0.38
M22	Navarra, Roncal, España	8.2	8.01	0.38
M31	Palencia, España	8.5	7.58	1.18
E60	Segovia, Moral Hornuez., España	8.3	7.35	1.04
E63	Segovia, Carabias, España	8.3	7.35	1.04
M26	Valencia, España	8.3	8.3	0.2
M27	Valencia, España	8.4	8.3	0.2
ABR7	Valladolid, Otero, España	8.0	7.91	0.81
M25	Valladolid, España	8.1	7.91	0.81
E64	Zaragoza, Frailes, España	8.5	8.27	0.24
E66	Almería, Cala chica, España	8.5	8.59	0.16
E67	Almería, San José, España	8.7	8.59	0.16
M17	Almería, Sorbas, España	8.7	8.59	0.16
M18	Almería, Cabo Gata, España	8.5	8.59	0.16
M19	Jaén, Tiscar, España	8.2	8.02	0.71

Nombre	Localidad	pH parcela muestreada	Media pH provincia	Desviación estandar
M20	Jaén, Tiscar, España	8.4	8.02	0.71
E68	Palmas, Lanzarote, España	----		
E69	Tenerife, Gomera, España	----		
M5	Faro, Portugal			
M7	Mogadour, Portugal			
M12	Albacete, Nerio, España	8.3	8,4	0,16
E70	Almeria, España	8.5	8.59	0.16
E71	Almeria, Cala, España	8.5	8.59	0.16
E72	Almeria, S. José, España	8.7	8.59	0.16
Hoyo de Pinares (HP)	Ávila, España	6.7	6.03	0.99
Cabeza de Buey (CB)	Badajoz, España	6.2	6.7	1.13
Castuera (CA)	Badajoz, Spain España	5.7	6.7	1.13
E73	Badajoz, España	6.7	6.7	1.13
Serradilla (SE)	Cáceres, España	5.4	5.42	0.71
M9	Cáceres, Monfrague, España	5.5	5.42	0.71
E74	Cáceres, España	7.9	5.42	0.71
M6	Cádiz, Algeciras, España	8.0	8.09	0.24
M3	Ciudad Real, España	8.2	7.64	0.97
M2	Córdoba, España	5.7	7.56	0.94
M8	Gerona, Rosas M., España	6.2	7.04	0.95
M13	Granada, Cubillas, España	8.5	8.37	0.42
M16	Granada, Baza, España	8.6	8.37	0.42
E75	Granada, España	8.5	8.37	0.42
Aracena (AR)	Huelva, España	6.8	6.53	1.08
Cortegana (CO)	Huelva, España	6.0	6.53	1.08
M15	Huelva, Lepe, España	5.3	6.53	1.08
E76	Huesca, España	7.9	8.36	0.20
M1	Jaen, Cazorla, España	8.2	8.02	0.71
M11	Jaén, España	8.4	8.02	0.71
E77	Jaén, España	8.2	8.02	0.71
E78	Jaén, España	8.2	8.02	0.71
E82	Las Palmas, Betancu., España	---	---	---
El Molar (EM)	Madrid, España	6.4	7.26	1.16
E79	Madrid, Patones, España	8.4	7.26	1.16
E80	Mallorca, S. Lluís, España	---	----	----
M14	Murcia, España	8.5	8.17	8.35
M10	Salamanca, Rio Agueda., España	4.8	5.94	1.01
E83	Tenerife, Buenavista., España	--		
E84	Tenerife, Gomera, España	---		
E81	Zaragoza, Puerto Cavero, España	8.6	8.27	0.24

Fuente: López y Grau (2004)